

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-017187

(43)Date of publication of application : 23.01.2001

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
 C12N 5/10
 //(C12N 5/10
 C12R 1:91)

(21)Application number : 2000-101615

(71)Applicant : BARTENSCHLAGER RALF

(22)Date of filing : 03.04.2000

(72)Inventor : BARTENSCHLAGER RALF

(30)Priority

Priority number : 99 19915178 Priority date : 03.04.1999 Priority country : DE

(54) HEPATITIS C VIRUS CELL CULTURE SYSTEM, HEPATITIS C VIRUS- RNA-CONSTRUCT, USE OF CELL CULTURE SYSTEM OR CONSTRUCT, OBTAINING OF MUTANT SUITABLE FOR CELL CULTURE OF HEPATITIS C VIRUS-RNA-CONSTRUCT, PRODUCTION OF MUTANT OF HEPATITIS C VIRUS-FULL LENGTH GENOME, HEPATITIS C VIRUS-PARTIAL GENOME OR OPTIONAL HEPATITIS C VIRUS-CONSTRUCT, HEPATITIS C VIRUS-CONSTRUCT SUITABLE FOR CELL CULTURE, ITS MUTANT, MUTANT OF HEPATITIS C VIRUS-FULL LENGTH GENOME, HEPATITIS C VIRUS PARTICLE OR VIRUSLIKE PARTICLE AND CELL INFECTED WITH THE SAME

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject new cell culture system mainly comprising a eucaryotic cell such as a human hepatic cancerous cell containing a genetic material comprising a specified hepatitis C virus (HCV)-specific gene and a marker gene transduced therinto and capable of detecting an HCV-RNA and an HCV-antigen according to a simple method.

SOLUTION: This new HCV cell culture system comprises a eucaryotic cell which is a human hepatic cancerous cell and is an HCV-RNA construct comprising transduced HCV- specific RNA-fragments 5'NTR, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B and 3'NTR having a nucleotide sequence described in the formula or the like and an additionally selective marker gene (selective gene) in the HCV cell culture system mainly comprising the eucaryotic cell containing a genetic material comprising a transduced HCV-specific genetic material. The cell culture system is capable of detecting an HCV-RNA or an HCV-antigen according to a simple method and is useful for the production and/or evaluations and/or tests, etc., of a therapeutic agent and/or a diagnostic agent for treating the HCV-infection.

AGGCGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGDCATCCGTTTTTTTAA
 GCCTTTTTTTTCTTTTCTTTTATGAGAGAGAGATCTACTCTTTTAA
 AGACATGAGAT

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-17187
(P2001-17187A)

(43) 公開日 平成13年1月23日 (2001.1.23)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
5/10		5/00	B 4 B 0 6 5
// (C 1 2 N 5/10			
C 1 2 R 1:91)			

審査請求 未請求 請求項の数19 O L (全 67 頁)

(21) 出願番号	特願2000-101615(P2000-101615)	(71) 出願人	500155615 ラルフ パルテンシュラーガー ドイツ連邦共和国 ガウーオーデルンハイ ム ナッハ デム アルテン シュロス 22
(22) 出願日	平成12年4月3日 (2000.4.3)	(72) 発明者	ラルフ パルテンシュラーガー ドイツ連邦共和国 ガウーオーデルンハイ ム ナッハ デム アルテン シュロス 22
(31) 優先権主張番号	1 9 9 1 5 1 7 8. 4	(74) 代理人	100061815 弁理士 矢野 敏雄 (外4名)
(32) 優先日	平成11年4月3日 (1999.4.3)		
(33) 優先権主張国	ドイツ (D E)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 C型肝炎ウイルス細胞培養系、C型肝炎ウイルス-RNA-構築物、細胞培養系または構築物の使用、C型肝炎ウイルス-RNA-構築物の細胞培養に適合した突然変異体を獲得する方法、C

(57) 【要約】

【課題】 HCV-RNA又はHCV-抗原を直接、信頼できるかつ実験室で通常の簡単な方法で検出できる細胞培養系を提供する。

【解決手段】 HCV特異的RNA断片である5' NTR、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5Bおよび3' NTRならびに付加的に少なくとも1つの選択可能なマーカー遺伝子 (選択遺伝子) を有するHCV-RNA-構築物を感染させたヒト肝細胞からなるC型肝炎ウイルス (HCV) 細胞培養系を使用する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 導入された HCV-特異的遺伝子材料を含有する、主に真核細胞を包含する C型肝炎ウイルス (HCV) 細胞培養系において、真核細胞がヒト肝細胞であり、かつ導入された HCV-特異的遺伝子材料が HCV-特異的 RNA-断片 5' NTR, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B 及び 3' NTR および付加的に選択可能なマーカー遺伝子 (選択遺伝子) を包含する HCV-RNA-構築物であることを特徴とする C型肝炎ウイルス (HCV) 細胞培養系。

10 【外 1】

【請求項 2】 HCV-特異的 RNA-断片 5' NT *

(a) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTT TTTT TTTA
GCTTTTTTTT TTTTCTTTTTTTTGAGAGAGAGAGTCTCACTCTGTTGCC
AGACTGGAGT

(b) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTT TTT
TTTTAGTCT TTTTTTTT TTTTTTTGA GAGAGAGAGT CTCACCTCTGT
TGCCAGACT GGAGC

(c) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTT TTT
TTTAATCTTT TTTTTTTTCT TTTTTTTGA GAGAGAGAGT CTCACCTCTGT
TGCCAGACT GCAGC

(d) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTT TTT
TTTTTAGTCT TTTTTTTT TCTTTTTTT TGAGAGAGAG AGTCTCACTC
TGTTGCCAG ACTGGAGT

(e) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTT TTT
TTTTAGTCT TTTTTTTT TCTTTTTTT TGAGAGAGAG AGTCTCACTC
TGTTGCCAG ACTGGAGT

(f) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTT TTT
TTTTAGTCT TTTTTTTT TCTTTTTTT TGAGAGAGAG AGTCTCACTC
CTGTTGCCA GACTGGAGT

(g) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTT TTT
TTTTAGTCT TTTTTTTT CTTTTTTT GAGAGAGAGAG
GTCTCACTCT GTTGCCAGAG CTGGAGT

(h) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTT TTT
TTTTTAAT CTTTTTTT TTTTCTTT TTTTGAGAGAG
GAGAGTCTCA CTCTGTTGCC CAGACTGGAG T

(i) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTT TTT
TTTTTAATC TTTTTTTT TTTCTTTT TTTTGAGAGAG
AGAGAGTCTC ACTCTGTTGC CCAGACTGGA GT

の群から選択されるヌクレオチド配列を有する請求項 2 記載の HCV-RNA-構築物。

【請求項 5】 HCV-RNA-構築物が請求項 2 から 4 までの少なくともいずれか 1 項記載の構築物である請求項 1 記載の細胞培養系。

【請求項 6】 HCV-RNA-構築物を含有する細胞がドイツ微生物保存機関 (DSMZ: ブラウンシュバイク、BRD 在) に寄託番号 DSM ACC 2394 (研究所記号 HuB1 9-13) として寄託されている請求項 1 記載の細胞培養系。

【請求項 7】 特に HCV-感染の治療のための治療剤

* R, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B 及び 3' NTR および付加的に選択可能なマーカー遺伝子 (選択遺伝子) を包含することを特徴とする HCV-RNA-構築物。

【請求項 3】 配列表の配列番号 1 から配列番号 11 までのいずれか 1 つに記載されたヌクレオチド配列を包含する請求項 2 記載の HCV-RNA-構築物。

【請求項 4】 3' NTR が以下に記載するヌクレオチド配列 (a) ~ (i) :

10 【外 1】

および/または診断剤の製造および/または評価および/またはテストのための、請求項 1 または請求項 5 から 6 までのいずれか 1 項記載の細胞培養系および/または請求項 2 から 4 までのいずれか 1 項記載の HCV-RNA-構築物の使用。

【請求項 8】 HCV-感染に対するワクチンの製造のための、請求項 1 または請求項 5 から 6 までのいずれか 1 項記載の細胞培養系および/または請求項 2 から 4 までのいずれか 1 項記載の HCV-RNA-構築物の使用。

【請求項 9】 遺伝子治療のための肝細胞特異的輸送体

の製造のための、請求項 2 から 4 までのいずれか 1 項記載の HCV-RNA-構築物の使用。

【請求項 10】 組み込まれた外来遺伝子を有し、この外来遺伝子の発現に好適である標的細胞中にこの外来遺伝子を導入するために好適である、請求項 2 から 4 までのいずれか 1 項記載の HCV-RNA-構築物。

【請求項 11】 請求項 2 から 4 までのいずれか 1 項記載の HCV-RNA-構築物の細胞培養に適合した突然変異体であって、HCV-RNA-構築物に比べて高められた複製効率を有する突然変異体、を獲得する方法において、導入された HCV-特異的遺伝子材料が請求項 2 から 4 までのいずれか 1 項記載の選択遺伝子を有する HCV-RNA-構築物である請求項 1 記載の細胞培養系を、選択遺伝子に応じた選択培地上／中で培養し、成長した細胞クローンを収穫し、この細胞クローンから HCV-RNA-構築物またはその部分を単離することを特徴とする、前記 HCV-RNA-構築物の細胞培養に適合した突然変異体を獲得する方法。

【請求項 12】 単離された HCV-RNA-構築物を新たに少なくとも 1 回継代し、すなわち単離された HCV-RNA-構築物を請求項 1 記載の細胞培養系の細胞に導入し、導入された HCV-特異的遺伝子材料が選択遺伝子を有する単離された HCV-RNA-構築物である請求項 1 に記載のその際得られた細胞培養系を選択遺伝子に応じた選択培地上／中で培養し、成長した細胞クローンを収穫し、この細胞クローンから HCV-RNA-構築物を単離する、請求項 11 記載の方法。

【請求項 13】 オリジナルの HCV-全長ゲノム又は HCV-部分ゲノム又は HCV-RNA-構築物と比較して高められた複製効率を有する HCV-全長ゲノム又は HCV-部分ゲノム又は任意の HCV-構築物の突然変異体を製造する方法において、請求項 11 または請求項 12 に記載の方法を用いて HCV-RNA-構築物の細胞培養に適合した突然変異体を製造し、これを単離し、これらの突然変異体のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を決定し、オリジナルの HCV-RNA-構築物のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列と比較して、核酸突然変異およびアミノ酸突然変異の種類、数、及び位置を決定し、かつこの突然変異を意図的な突然変異誘発により、または該当する突然変異を有する配列断片の置換により、(単離された) HCV-全長ゲノムまたは HCV-部分ゲノムまたは任意の HCV-RNA-構築物中へ導入する、ことを特徴とする、前記突然変異体の製法。

【請求項 14】 高められた複製効率を有する細胞培養に適合した HCV-RNA-構築物において、ヌクレオチド突然変異及び／又はアミノ酸突然変異により請求項 2 から 4 までのいずれか 1 項記載の HCV-RNA-構築物から誘導可能であり、かつ請求項 11 から 13 までのいずれか 1 項記載の方法により得ることができること

を特徴とする、高められた複製効率を有する細胞培養に適合した HCV-RNA-構築物。

【請求項 15】 次に記載するアミノ酸置換、すなわち：1283 arg → gly および／または 1383 glu → ala および／または 1577 lys → arg および／または 1609 lys → glu および／または 1936 pro → ser および／または 2163 glu → gly および／または 2330 lys → glu および／または 2442 ile → val を 1 個またはそれ以上有する、請求項 14 記載の細胞培養に適合した HCV-RNA-構築物。

【請求項 16】 表 3 に記載されたヌクレオチド置換および／またはアミノ酸置換の 1 つまたはそれ以上を有し、この際表 3 は該請求項に包含される、請求項 14 または 15 記載の細胞培養に適合した HCV-RNA-構築物。

【請求項 17】 オリジナルの HCV-RNA-構築物またはオリジナルの HCV-全長ゲノムと比較して高められた複製効率を有する HCV-RNA-構築物または HCV-全長ゲノムの細胞培養に適合した突然変異体において、請求項 13 記載の細胞培養に適合した HCV-RNA-構築物中で配列分析および配列比較により、これらの突然変異の種類および数を決定し、かつこれらの突然変異を意図的な突然変異誘発により、または該当する突然変異を有する配列断片の置換により、HCV-RNA-構築物中に、特に請求項 2 から 4 までのいずれか 1 項記載の HCV-RNA-構築物中に、または(単離された) HCV-RNA-全長ゲノム中に導入することを特徴とする、HCV-RNA-構築物または HCV-全長ゲノムの細胞培養に適合した突然変異体。

【請求項 18】 請求項 11 から 13 までのいずれか 1 項記載の方法で得られることを特徴とする、C 型肝炎ウイルス粒子またはウイルス様粒子。

【請求項 19】 請求項 18 記載の C 型肝炎ウイルス粒子またはウイルス様粒子に感染した細胞。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、導入された HCV-特異的遺伝子材料を含有する、つまり HCV-特異的遺伝子材料がトランスフェクションされている主に真核細胞を包含する C 型肝炎ウイルス (HCV) 細胞培養系に関する。

【0002】

【従来の技術】C 型肝炎ウイルス (HCV) は世界的規模での慢性及び急性の肝疾患の主要原因である。たいていの HCV 感染は認識できる臨床的症状なしで進行し、感染者の 80～90% が持続的なウイルスキャリアとなり、この持続的ウイルスキャリアの 50% が多様な症状の慢性肝炎になる。この慢性感染者の約 20% が 1

0～20年の経過において肝硬変に進行し、その結果第1次肝細胞ガンが生じることがある。この慢性のC型肝炎は今日では肝臓移植が主な感染原因である。原因療法はまだ存在しない。現在提供可能な若干の治療法はインターフェロナーアルファの又はインターフェロナーアルファとプリンヌクレオシド類似体のリバビリンとからの組み合わせの高い用量での投与である。全治療者の約60%がこの治療法に効果を示すだけであり、その際に、全ての事例の半分以上が治療の中止後に新たなウイルス血症に至る。

【0003】工業国においても、罹患率が高く、慢性感染の深刻な結果及び原因療法がないために、HCV-特異的薬療法の発展が製薬学の研究及び開発の重大な目標である。この際の主要な問題は、今まで、真核細胞中でのウイルス複製及び発病の研究を可能にする適当な細胞培養系がなかったことである。

【0004】血中及び組織中でのわずかなウイルス量のため、適当な細胞培養系又は動物モデル（今日までチンパンジーが唯一可能な試験動物である）がないため、並びにウイルス様の粒子を製造する有効な系もないため、HCV-粒子の分子組成は今日まで詳細には研究もしくは解明されていない。現在存在する結果は次のようにまとめることができる：HCVは、50～60nmの粒子直径及び1.03～1.1g/mlの平均密度を有する外被を有するプラス鎖のRNAウイルスである。これは最初に1989年に分子的にクローニングされ、特性決定された（Choo et al., 1989: Science, 244, 359-362）。このHCV-RNAは約9.6kb（＝9600ヌクレオチド）の長さ及び正の極性を有し、約3010個のアミノ酸の線状ポリタンパク質をコードする唯一のオープンリーディングフレーム（ORF＝open reading frame）を有する（Rice 1996, in Virology, B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, Eds. (Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, 1996), vol. 1, pp. 931-960; Clarke 1997, J. Gen. Virol. 78, 2397; and Bartenschlager 1997, Intervirology 40, 378 and Fig. 1A参照）。ウイルス複製においてこのポリタンパク質は細胞の及びウイルスのプロテアーゼによって成熟した、機能的に活性のタンパク質の形に分解される。

【0005】ポリタンパク質の中で、タンパク質は次のように配列されている（アミノ末端からカルボキシ末端へ）：Core-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B。このコアタンパク質（Core-Protein）はヌクレオキャプシドの主成分である。糖タンパク質E1及びE2は膜貫通タンパク質であり、ウイルス外被の主成分である。このタンパク質は宿主細胞へのウイルスの付着の際におそらく重要な役割があると考えられる。この3種のタンパク質のコア、E1及びE2はウイルス粒子を構築し、従って構造タンパク質として表される。タンパク質p7の機能は未だに明ら

かではない。タンパク質NS2はおそらくNS2-3プロテアーゼの接触ドメインであり、これはタンパク質NS2とNS3との間のプロセシング（Prozessierung）に関与している。タンパク質NS3は2つの機能を有しており、つまり、アミノ末端のドメインにおいてポリタンパク質プロセシングに不可欠のプロテアーゼ活性を有し、かつカルボキシ末端のドメインにおいてはおそらくウイルスRNAの複製の際に重要な役割があると考えられるNTPase/ヘリカーゼ機能を有する。タンパク質NS4AはNS3-プロテアーゼのコファクターである。タンパク質NS4Bの機能はわかっていない。

【0006】このオープンリーディングフレームは、5'末端に約340個のヌクレオチドの長さの翻訳されない領域（NTR＝non-translated region）があり、これは内部のリボソームエンタリー位置（IRES＝internal ribosome entry site）として機能し、3'末端には約230個のヌクレオチドの長さのNTRがあり、これは高い可能性でゲノム複製にとって重要である。このような3' NTRはPCT/US96/14033の特許出願の対象である。ポリタンパク質のアミノ末端区域中の構造タンパク質は、宿主細胞のシグナルペプチダーゼにより分解される。非構造タンパク質（NS）2～（NS）5Bは2つのウイルス酵素によって、つまりNS2-3及びNS3/4Aプロテイナーゼによってプロセシングされる。このNS3/4AプロテイナーゼはNS3のカルボキシ末端の向こう側の全ての分解にとって必要である。NS4Bの役割は未だ明らかではない。NS5Aは高度にリン酸化されたタンパク質であり、インターフェロンに対する多様なHCV-遺伝子型の耐性に関与していると考えられ（Enomoto et al. 1995, J. Clin. Invest. 96, 224; Enomoto et al. 1996, N. Engl. J. Med. 334, 77; Gale Jr. et al. 1997, Virology 230, 217; Kaneko et al. 1994, Biochem. Biophys. Res. Commun. 205, 320; Reed et al., 1997, J. Virol. 71, 7187参照）、NS5BはRNA依存性のRNAポリメラーゼとして同定された。

【0007】この認識をもとにして、RT-PCR（＝逆転写ポリメラーゼ連結反応）を用いた患者の血清中でのHCV特異的抗体の検出に基づくか又はHCV特異的RNAの検出に基づく診断系が開発され、この診断系は通常の及び/又は規定に従い全ての保存血液において適用しなければならない。

【0008】Genoms 1989の最初の記載以来、PCR法を用いてHCVの多数の部分配列及び完全配列がクローニングされ、特性決定された。この配列の比較は、ウイルスゲノムの特にNS5B-遺伝子の領域内での高い変異性を示し、これは最終的に6つの遺伝子系に分類され、これらはさらにサブタイプa、b及びcに細分化される。ゲノムの分散はゲノムにわたって均質に分布していない。従って、5' NTR及び3' NTRの一部は高

い確率で維持されているが、一方で特定のコードする配列、特にコートタンパク質E1及びE2は現在きわめて著しく変化している。

【0009】クローニングされ、特性決定されたHCVゲノムの部分配列及び完全配列はさらに見込みのある抗ウイルス性治療薬のための適当な攻撃標的として研究された。この場合、このような攻撃標的として考えられる3つのウイルス性酵素が発見された。これらは(1)NS3/4Aプロテアーゼ複合体、(2)NS3ヘリカーゼ及び(3)NS5B RNA-依存性RNAポリメラーゼである。NS3/4Aプロテアーゼ複合体及びNS3ヘリカーゼはすでに結晶化され、その3次元構造に関して解明することができており (Kim et al., 1996, Cell, 87, 343; Yem et al., 1998, Protein Science, 7, 837; Love et al., 1996, Cell, 87, 311; Kim et al., 1998, Structure, 6, 89; Yao et al., Nature Structural Biology, 4, 463; Cho et al., 1998, J. Biol. Chem., 273, 15045)、NS5B RNA依存性RNAポリメラーゼの解明が今日までなお成功していない。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】この酵素を用いた重要な攻撃標的は慢性HCV感染の治療法の開発のために定義されているにもかかわらず、かつ「合理的ドラッグデザイン」を用いて並びに「高いスループットスクリーニング」を用いて世界的に適当な阻害剤を集中的に探しているにもかかわらず、この治療法の発展は著しい欠乏に直面している、つまり、HCV-RNA又はHCV-抗原を直接、信頼できるかつ実験室で通常の簡単な方法で検出できる細胞培養系又は簡単な動物モデルの欠乏に直面している。このような細胞培養系の不足は、HCV複製の理解が今日までなお不備でありかつかなりの部分で未だ仮説であることに対する主要な原因である。

【0011】専門分野の解釈によると、HCVとフラビウイルス及びペスチウイルスとの間に狭い進化的関連があり、多様な細胞系において簡単に複製することができかつこの場合比較的高い収率が示されている自律複製RNAについて説明されているにもかかわらず (Khromykh et al., 1997, J. Virol. 71, 1497; Behrens et al., 1998, J. Virol. 72, 2364; Moser et al., 1998, J. Virol. 72, 5318参照)、HCVを用いた同様な試験は今まで成果がなかった。

【0012】HCV含有の高力価の (hochtitrig) 患者の血清で感染させることができる細胞系又は初代細胞培養は多様な刊行物から公知であるが (Lanford et al. 1994, Virology 202, 606; Shimizu et al. 1993, Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 90, 6037-6041; Mizutani et al. 1996, Journal of Virology, 70, 7219-7223; M. Ikeda et al. 1998, Virus Res. 56, 157; Fournier et al. 1998, J. Gen. Virol. 79, 2376及びそこで引用された文献, Ito et al. 1996,

Journal of General Virology, 77, 1043-1054)、ウイルス感染された細胞系又は細胞培養はHCV-RNA又はHCV-抗原は直接検出されなかった。この細胞中のウイルス性のRNAはノーザンブロット (RNAの定量的検出のための標準的方法) においても検出できず、ウェスタンブロットにおいて又は免疫沈降を用いてもウイルス性タンパク質は検出できない。著しく煩雑でかつ間接的方法を用いて、HCV複製を証明することができたにすぎない。この不利な状況は、この公知のウイルス感染した細胞系又は細胞培養中での複製が全く不十分であることを明らかに示している。

【0013】さらに、Yoo et al. (1995, Journal of Virology, 69, 32-38) 及び Dash et al., (1997, American Journal of Pathology, 151, 363-373) の刊行物から、肝癌細胞系を、クローニングされたHCV-ゲノムのインビトロ転写を用いて得られた合成HCV-RNAでトランスフェクションできることが公知である。この2つの文献においてこの著者は、ウイルス性HCV-ゲノムがプラス鎖-RNAであり、このRNAは細胞中へ導入した後に直接mRNAとして機能し、これにリボソームが付着し、翻訳プロセスの進行においてウイルスタンパク質を形成し、このタンパク質から最終的に新規のHCV-粒子が形成される (できる) という基本思想から出発している。このウイルス複製、つまり新規に形成されたHCV-ウイルスもしくはそのRNAは、RT-PCRを用いて検出された。しかしながら、実施されたRT-PCRの発表された結果は、記載されたHCV-トランスフェクションされた肝癌細胞内でHCV複製の効率は著しくわずかであり、見込みのある抗ウイルス療法を用いた意図的な影響による複製率における変動を質的に、ましてや定量的に測定するためにはいずれの場合も不十分である。さらに、先行技術において、高保存3' NTR (hochkonservierte 3' NTR) はウイルス複製のために不可欠であることは公知であり (Yanagi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 2291-95, 1999)、このことはHCV-ゲノムの確かな3' 末端を知らずに試験したためもっぱら短縮された3' NTRを有するHCV-ゲノムを使用したYoo et al. 及びDash et al. の主張と明らかに矛盾している。

【0014】

【課題を解決するための手段】この課題の解決策は、冒頭に記載した種類の細胞培養系を提供することであり、その際、真核細胞はヒト細胞、特に市販の肝癌細胞系から由来するが、同様に相応する初代細胞培養から得ることができる肝癌細胞であり、その際、導入されたHCV-特異的遺伝子材料がHCV-RNA-構築物であり、この構築物は主にHCV-特異的RNA-断片5' NTR, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B及び3' NTRを、有利に前記の順序で、及び少なくとも1つの選択可能なマーカー遺伝子 (選択遺伝子) を包

含する。「NTR」は本願明細書中で「非翻訳領域」を意味し、これは当業者に概念並びに略語として公知及び周知である。「HCV-RNA-構築物」の概念は本願明細書において完全なHCV-ゲノムを含有する構築物でも、単にそのHCV-ゲノムの一部、つまりHCV-サブゲノムを含有する構築物でもある。

【0015】実際に著しく有利である本発明による細胞培養系の有利な変異形は、DSMACC 2394の番号の元で(実験室記号HuB19-13) DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH in Braunschweig, Deutschland) に寄託されている。

【0016】本発明による細胞培養系を用いて初めて、HCV-RNAは細胞内で、自律的に及び十分に大量に複製及び発現され、その結果、HCV-RNA-量並びにHCV-特異的タンパク質の定量的測定を通常の、信頼できる正確な生化学的測定方法を用いて実施することができるインビトロ系が提供される。つまり、抗ウイルス性医薬の開発及び検査のために必要なほぼ信頼できる細胞ベース (cell-based) の複製系が提供される。この試験系は有効なHCV特異的な治療法のための潜在的攻撃標的を同定し、かつHCV化学療法剤を開発及び評価することを可能にする。

【0017】本発明は、少なくとも5' 及び3' 非翻訳領域 (NTR) 及び非構造タンパク質 (NS) 3~5Bを包含し、さらに選択可能なマーカー遺伝子 (選択遺伝子) を有するHCV-RNA-構築物で細胞をトランスフェクションした場合に、HCV-RNAの有効な複製が細胞中で行われるという意外な認識に基づく。構造遺伝子が複製の進行のためにあまり重要でなく、他方でこのトランスフェクションされた細胞がHCV-RNAと結合した選択可能なマーカー遺伝子 (選択遺伝子) により媒介される永続的な選択圧力を被る場合にのみHCV-RNAの有効な複製が引き起こされることは明らかである。マーカー遺伝子 (選択遺伝子) は従って、一方でHCV-RNAを生産複製する細胞の選択を誘発させ、他方でRNA-複製の効率を著しく高めると考えられる。

【0018】本発明の対象は、HCV-特異的RNA-断片5' NTR, NS3, NS4A, NS4B, NS5 40

A, NS5B及び3' NTRを、有利に前記の順序で包含し、さらに選択可能なマーカー遺伝子 (選択遺伝子) を包含するセルフリーのHCV-RNA-構築物でもある。

【0019】5' NTRもしくはNS3もしくはNS4AもしくはNS4BもしくはNS5AもしくはNS5Bもしくは3' NTRの概念は、本願明細書において、先行技術においてHCVゲノムのそれぞれ該当する機能的断片についてのヌクレオチド配列として記載されている各ヌクレオチド配列を表す。

【0020】このようなHCV-RNA-構築物の提供が、初めて細胞培養中でのHCV-複製、HCV-発病及びHCV-進化の詳細な分析を可能にする。HCV特異的なウイルス性RNAは、完全なゲノムとして又はサブゲノムとして、任意の量で意図的に製造でき、RNA-構築物を操作し、ひいてはHCV-機能を遺伝学的レベルで研究及び解明する可能性が生じる。

【0021】治療法のための主要な攻撃標的として現在研究されている全てのHCV-酵素、つまりNS3/4Aプロテアーゼ、NS3ヘリカーゼ及びNS5Bポリメラーゼは本発明によるHCV-RNA-構築物中に含まれているため、該当する全ての研究のために使用することができる。

【0022】実地での適用において著しく良好であるHCV-RNA-構築物の実施態様は、配列表の配列番号1によるヌクレオチド配列を包含することを特徴とする。実地での使用のために同等に良好な特性を有する他の実施態様は、配列表の配列番号2又は配列番号3又は配列番号4又は配列番号5又は配列番号6又は配列番号7又は配列番号8又は配列番号9又は配列番号10又は配列番号11によるヌクレオチド配列を包含することを特徴とする。

【0023】本発明によるHCV-サブゲノム-構築物は、先行技術において今まで未知のヌクレオチド配列、つまり次に記載するヌクレオチド配列 (a) ~ (i) のグループから選択されるヌクレオチド配列を有する3' NTRを備えることができる。

【0024】

【外2】

- 11 12
- (a) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTTTTTTTA
GCTTTTTTTTTTTCTTTTTTTTGAGAGAGAGAGTCTCACTCTGTTGCC
AGACTGGAGT
- (b) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTTT
TTTTTAGTCT TTTTTTTTTC TTTTTTTTGA GAGAGAGAGT CTCACTCTGT
TGCCAGACT GGAGC
- (c) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTTT
TTTAATCTTT TTTTTTTTCT TTTTTTTTGA GAGAGAGAGT CTCACTCTGT
TGCCAGACT GCAGC
- (d) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTTT
TTTTTAGTCT TTTTTTTTTC TTTTTTTTGA GAGAGAGAGT CTCACTCTGT
TGTTGCCAG ACTGGAGT
- (e) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTTT
TTTTTAGTCT TTTTTTTTTC TTTTTTTTGA GAGAGAGAGT CTCACTCTGT
TGTTGCCAG ACTGGAGT
- (f) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTTT
TTTTTAGTCT TTTTTTTTTC TTTTTTTTGA GAGAGAGAGT CTCACTCTGT
TGTTGCCAG ACTGGAGT
- (g) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTTT
TTTTTAGTCT TTTTTTTTTC TTTTTTTTGA GAGAGAGAGT CTCACTCTGT
TGTTGCCAG ACTGGAGT
- (h) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTTT
TTTTTTAAT CTTTTTTTTT TTTTCTTTT TTTTGAGAGA
GAGAGTCTCA CTCTGTTGCC CAGACTGGAG T
- (i) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTTT
TTTTTTAAT CTTTTTTTTT TTTTCTTTT TTTTGAGAG
AGAGAGTCTC ACTCTGTTGC CCAGACTGGA GT

【0025】本発明によるHCV-RNA-構築物中に含まれる選択可能なマーカー遺伝子（選択遺伝子）は有 30
利に耐性遺伝子、特に抗生物質耐性遺伝子である。

【0026】これは、例えば抗生物質耐性遺伝子の場合には該当する抗生物質を細胞培地に添加することによって、この構築物でトランスフェクションされた細胞が、トランスフェクションされていない細胞から容易に選択することができるという利点を有する。「抗生物質」とは本願明細書中ではトランスフェクションされていない宿主細胞又はHCV-RNAをわずかな効率でしか複製していない細胞の生存及び成長を阻害する物質、特に細胞毒、例えばピューロマイシン、ハイグロマイシン、ゼオシン（Zeocin）、ブレオマイシン又はブラストサイジン 40
であると解釈される。

【0027】実地において著しく良好であるとされた特に良好な選択可能なマーカー遺伝子（選択遺伝子）もしくは耐性遺伝子は、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子である。

【0028】抗生物質耐性遺伝子の他のものは、例えばHAT-選択を用いて実施することができるチミジンキナーゼ遺伝子である。

【0029】選択可能なマーカー遺伝子（選択遺伝子） 50

もしくは有利な耐性遺伝子もしくは特に有利な抗生物質耐性遺伝子のHCV-RNA-構築物中の位置は、有利にHCV 5' NTRの後方に、つまり5' NTRの下流にもしくはHCV-読み枠の上流にある。しかしながら、3' NTRの領域内又はHCV-ゲノム又はHCV-サブゲノムの他の部位、例えばポリタンパク質の範囲内にあることも考えられる。

【0030】本発明によるHCV-RNA-構築物のもう一つの実施態様において、選択可能なマーカー遺伝子（選択遺伝子）、特に抗生物質耐性遺伝子は、リボザイムを介してもしくはリボザイムに対する認識部位を介してHCV-RNAもしくはHCV-ゲノム配列又はサブゲノム配列と結合している。

【0031】このために、HCV-RNAを産生複製するような細胞の選択を行うことにより、そこから得られた細胞クローンは耐性遺伝子をHCV-サブゲノム配列のリボザイム媒介性分解により分離することができる、つまりクローニングにより組み込まれたリボザイムの活性化によるか、又はリボザイムに対する認識部位を有する構築物の場合には細胞中へリボザイムを（例えばリボザイム構築物のトランスフェクション又は相応するリボザイムが導入されたウイルス性発現ベクターでの

感染により) 導入することにより分離できることが有利である。このように、確かな感染性ウイルス粒子の形成が可能である耐性遺伝子を有する確かなHCV-ゲノム-構築物が得られる。

【0032】本発明によるHCV-RNA-構築物のもう一つの有利な実施態様は、構築物が少なくとも1つの組み込まれたリポーター遺伝子を有することにより優れている。

【0033】リポーター遺伝子とは、このリポーター遺伝子の存在で目的生物中へ導入することにより容易に及び一般的に簡単な生化学的又は組織化学的方法で検出可能である、つまり少量であっても実験室で通常の測定方法を用いて簡単でかつ確実に検出及び定量化することができるタンパク質をコードするような遺伝子であると解釈される。

【0034】HCV-RNA-構築物のこの変異形は、この構築物の複製の程度がリポーター遺伝子産物によって簡単にかつ迅速に実験室で通常の方法により測定できるという利点を有する。

【0035】このリポーター遺伝子は、ルシフェラーゼ遺伝子のグループ、CAT-遺伝子(クロラムフェニコール-アセチルトランスフェラーゼ-遺伝子)、lacZ-遺伝子(ベクター-ガラクトシダーゼ遺伝子)、GFP-遺伝子(緑色-蛍光-タンパク質-遺伝子)、GUS-遺伝子(グルクロニダーゼ遺伝子)又はSEAP-遺伝子(分泌-アルカリ性-ホスファターゼ-遺伝子(Sezernerte-Alkalische-Phosphatase-Gen))からの遺伝子が有利である。このリポーター遺伝子もしくはその産物、つまり相応するリポータータンパク質は、例えば蛍光、化学ルミネッセンス、比色法又は免疫法(例えばELISA)を用いて測定することができる。

【0036】リポーター遺伝子として、代理マーカー遺伝子(Surrogatmarkergen)も挙げられる。この遺伝子は本願明細書において、細胞タンパク質、核酸又は一般にウイルス複製に依存するバリエーションの影響下にあるような機能をコードし、かつその結果HCVもしくはHCV-RNA-構築物を増幅する細胞中で抑制又は活性化される遺伝子と解釈される。つまり、この機能の低下もしくは活性化は、ウイルス複製用もしくはHCV-RNA-構築物の複製用の代用マーカーである。

【0037】リポーター遺伝子及び選択可能なマーカー遺伝子(選択遺伝子)の位置は、両方の遺伝子産物から形成される融合タンパク質を発現するように選択することができる。この場合、両方の遺伝子がHCV-RNA-構築物中に配置されており、両方の発現されたタンパク質は、プロテアーゼ(例えばユビキチン)の切断部位又は自己切断するペプチド(例えばピコルナウイルスの2A-タンパク質)を介して融合されていて、後になってタンパク質分解により再び分離されるという有利な可能性が生じる。

【0038】同様に、この両方の位置は、両方の遺伝子産物が別々に発現されるように相互に隔てられていてもよい(例えば次の順序: マーカー遺伝子もしくは耐性遺伝子-内部のリボソーム結合部位-リポーター遺伝子)。

【0039】リポーター遺伝子の場合には、リポーター遺伝子がHCV-ゲノム又はHCV-サブゲノムのオープンリーディングフレーム中へクローニングにより導入されていて、つまりタンパク質分解のプロセッシングによって活性形に変換されるような実施態様が特に有利である。

【0040】全てのバリエーションにおける本発明による細胞培養系は多様な目的のために使用することができる。これは次のことを包含する:

- ・ 抗ウイルス性に作用する物質の探索。これは例えば、直接又は間接的にウイルス増加に影響する有機化合物(例えばウイルス性プロテアーゼ、NS3-ヘリカーゼ、NS5B RNA依存性RNAポリメラーゼの阻害剤)、HCV-RNA-構築物内の任意の標的配列(例えば5' NTR)にハイブリダイズし、ウイルス増加に直接又は間接的に影響するアンチセンスオリゴヌクレオチド(例えば任意のHCV-RNA-配列を分解し、それによりウイルス複製を妨害するHCV-ポリタンパク質又はリボエンザイムの翻訳の減少に基づく)。

【0041】・ 細胞培養中での抗ウイルス性に作用する各種の物質の評価。このような物質は例えば単離生成された酵素に関して「合理的ドラッグデザイン(rational drug design)」を用いて並びに「高いスループットスクリーニング(high-throughput screening)」を用いて見出すことができる。評価とは、特に相応する物質の阻害特性の測定並びにその作用メカニズムの決定であると解釈される。

【0042】・ HCV特異的抗ウイルス療法のためのウイルス性又は細胞性の起源の新規の攻撃標的の同定。例えば細胞タンパク質がウイルス増殖のために重要である場合には、この細胞タンパク質の阻害によってウイルス増殖に影響を及ぼすことができる。このような補助的因子の探索は本発明による系を用いて可能である。

【0043】・ 耐性測定のための使用。HCV-ゲノムの高い突然変異誘発率に基づき治療法に対する耐性が生じることがある。このような耐性は物質の臨床的認可の際に重要であり、本発明による細胞培養系を用いて測定できる。HCV-RNA-構築物もしくはHCV-ゲノム又はサブゲノムを複製する細胞系は、相応する物質の濃度を増加させながらインキュベートし、ウイルスRNAの複製を導入したリポーターにより又はウイルス性の核酸又はタンパク質の定性的又は定量的測定により決定する。HCV-RNAの(例えばRT-PCRを用いた)再クローニング及び配列分析により治療の耐性に原因のあるヌクレオチドもしくはアミノ酸交換率を算出

することができる。

【0044】・ 診断薬の開発及び／又は評価のための確かなウイルスタンパク質（抗原）の製造。本発明による細胞培養系は細胞培養中でのHCV-抗原の発現を可能にする。この抗原は、特に診断検出法の構築のためにも使用できる。

【0045】・ 特に治療法及びワクチンの開発及び製造のため並びに診断目的のためのHCVウイルス及びウイルス様粒子の製造。本発明による細胞培養系を用いて製造することができる特に細胞培養に適合した完全なHCV-ゲノムは、細胞培養中で高い効率で複製することができる。このゲノムはHCVの全ての機能を有しており、従って感染性のウイルスを製造できる。

【0046】想定される本発明によるHCV-RNA-構築物は、その全てのバリエーションにおいて多方面の目的のために使用することができる。これには特に次のことが属する：

・ 弱毒化C型肝炎ウイルス又はHCV様粒子の構築及びその細胞培養中での製造：偶然又は意図的に引き起こされた突然変異、例えば点突然変異、欠失又は挿入により、弱毒化HCV粒子又はHCV様粒子を製造することができる、つまり完全に複製能力を有するが、病原性は少ないか又は失っているウイルスもしくはウイルス様粒子を製造することができる。このような弱毒化HCV粒子又はHCV様粒子は特にワクチンとして使用可能である。

【0047】・ 例えば遺伝子治療における肝細胞特異的遺伝子輸送体として使用するための外来遺伝子を組み込まれたHCV-RNA-構築物の構築。HCVの優れた向肝細胞性及びそのゲノムの一部を異種配列に置き換えるという理由から、例えば構造タンパク質を治療上有効な遺伝子に置き換えたHCV-RNA-構築物を製造できる。こうして得られたHCV-RNA-構築物は欠損するHCV機能、例えば構造タンパク質を構成的に又は誘導可能に発現する細胞内へ有利にトランスフェクションによって導入される。「トランス相補性 (Transkomplementation)」の概念のもとで当業者に公知のこの技術により、HCV-RNA-構築物が組み込まれたウイルス粒子を製造することができる。こうして得られた粒子は有利に肝細胞に感染させるために使用することができる。この細胞内で治療上有効な外来遺伝子を発現させ、それにより治療作用を発揮させる。

【0048】・ 生産的なウイルスの増加が行われる許容細胞の探索。この目的のために、完全な感染性ウイルスの形成が可能である前記のHCV-RNA-ゲノム構築物の一つを使用するか、又はこれらの構築物は前記のHCV-サブゲノム-構築物の一つを使用し前記の例に従って欠損する機能を構成的に又は誘導可能に発現する細胞系中へトランスフェクションされる。この全ての場合に、付加的にHCV-配列に耐性遺伝子及び／又はリ

ポーター遺伝子を有するウイルス粒子が生じる。HCVを複製することができる細胞を探索するために、この細胞をこうして製造されたウイルスで感染させ、抗生物質により選択するか又はHCV-RNA-構築物に依存してリポーター遺伝子の発現の検出を調査する。HCV-RNA-構築物を複製する場合、抗生物質耐性もしくはリポーター遺伝子の発現は検出可能であるため、こうして見出された細胞は許容性でなければならない。このように、ほぼ任意の細胞系又は初代細胞がその許容性について試験され、探索される。

【0049】本発明による細胞培養系は、HCV-RNA-複製の範囲内で偶然に生じるか又はこの構築物中へ意図的に導入される突然変異に基づき、複製効率の向上を引き起こすHCV-RNA-構築物の探索を可能にする。HCV-RNA-構築物の複製を変化させるこのような突然変異は、当業者には適合突然変異 (adaptive Mutationen) として公知である。本発明は従って、細胞培養に適した突然変異体を獲得する方法でもあり、その際、この突然変異体はオリジナルのHCV-RNA-構築物と比べて高められた複製効率を有する。本発明はさらに、オリジナルのHCV-RNA-全長ゲノム又はHCV-RNA-部分ゲノム又はHCV-RNA-構築物と比較して高められた複製効率を有するHCV-RNA-全長ゲノム又はHCV-RNA-部分ゲノム又は任意のHCV-RNA-構築物の突然変異体の製造方法を並びにオリジナルの構築物、部分ゲノム又は全長ゲノムと比較して高められた複製効率を有するHCV-RNA-構築物、HCV-全長ゲノム及びHCV-部分ゲノムを包含する。

【0050】突然変異体がHCV-RNA-構築物に比べて高められた複製効率を有する本発明によるHCV-RNA-構築物の細胞培養に適合した突然変異体を獲得するための本発明による方法は、導入されたHCV-特異的遺伝子材料が請求項2から8までのいずれか1項記載の選択遺伝子を有するHCV-RNA-構築物である請求項1記載の細胞培養系を、選択遺伝子に応じた選択培地上／中で培養し、成長した細胞クローンを収穫し、この細胞クローンからHCV-RNA-構築物を単離することを特徴とする。

【0051】この製造方法の有利な実施態様において、単離されたHCV-RNA-構築物は新たに少なくとも1回継代される、つまり請求項1による細胞培養系の細胞に導入され、導入されたHCV-特異的遺伝子材料が選択遺伝子を有する単離されたHCV-RNA-構築物である請求項1によるその際得られた細胞培養系を選択遺伝子に応じた選択培地上／中で培養し、成長した細胞クローンを収穫し、このクローンからHCV-RNA-構築物を単離する。

【0052】この変更された方法を用いて適合突然変異の程度ひいては複製効率の程度は該当するHCV-RN

A-構築物中でお高めることができる。

【0053】オリジナルのHCV-全長ゲノム又はHCV-部分ゲノム又はHCV-RNA-構築物と比較して高められた複製効率を有するHCV-全長ゲノム又はHCV-部分ゲノム又は任意のHCV-RNA-構築物の突然変異体を製造する本発明による方法は、前記の2つの製造方法を用いて、HCV-RNA-構築物の細胞培養に適合した突然変異体を製造し、これを細胞から単離し、先行技術において公知の方法でクローニングし、配列決定し、オリジナルのHCV-RNA-構築物のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列と比較して、突然変異の種類、数、及び位置を決定し、かつこの突然変異を意図的な突然変異誘発又は該当する突然変異を有する配列断片の置換により、(単離された)HCV-全長ゲノム又はHCV-部分ゲノム又は任意のHCV-RNA-構築物中へ導入することを特徴とする。

【0054】実際に複製を変化させる及び特に複製を向上させる突然変異の検出もしくは照合のために、特定のヌクレオチド置換及び／又はアミノ酸置換をオリジナルのHCV-RNA-構築物内へ導入し、これを再び細胞培養中へ導入する試験を実施することができる。導入された突然変異が実際に複製を向上させる場合には、選択可能なマーカー遺伝子を有するHCV-RNA-構築物の場合に、人工的に突然変異誘発された構築物において耐性の細胞クローンの数が未処理の構築物の際よりも明らかに高くなる。

【0055】高められた複製効率を有する本発明による細胞培養に適合したHCV-RNA-構築物は、ヌクレオチド置換及び／又はアミノ酸置換により請求項2から8のいずれか1項記載のHCV-RNA-構築物から誘導可能であり、2つの前記製造方法を用いて得ることができることを特徴とする。

【0056】この細胞培養に適合したHCV-RNA-構築物は、高められた複製効率を有する任意のHCV-RNA-構築物又はHCV-全長ゲノム又は部分ゲノムを製造するために使用することができる。この場合、選択可能な耐性遺伝子を有する構築物並びにこのような耐性遺伝子なしのもしくは選択可能なリポーター遺伝子(例えばルシフェラーゼ)を有する構築物を製造することができる、それというのも細胞培養に適合したHCV-RNA-構築物の高い複製効率に基づき、この複製を選択されていない細胞中でも検出することができるためである。

【0057】オリジナルのHCV-RNA-構築物又はオリジナルのHCV-全長ゲノムと比較して高められた複製効率を有する、HCV-RNA-構築物又はHCV-全長ゲノム又はHCV-部分ゲノムの本発明による細胞培養に適合した突然変異体は、細胞培養に適合したHCV-RNA-構築物中に、配列分析及び配列比較により、突然変異の種類及び数を決定し、この突然変異をH

CV-RNA-構築物中へ、特に請求項2から8までのいずれか1項記載のHCV-RNA-構築物中へ意図的な突然変異誘発によるか又は該当する突然変異を有する配列断片の置換により導入する方法により得られることを特徴とする。

【0058】高いか又は著しく高い複製効率及び実地の適用のために著しく良好な適性を有する特に有利なHCV-RNA-構築物、HCV-全長ゲノム及びHCV-部分ゲノムのグループは、これが表3に記載した全てのアミノ酸置換もしくはヌクレオチド置換及び／又は次の1以上のアミノ酸置換: 1283 arg → gly, 1383 glu → ala, 1577 lys → arg, 1609 lys → glu, 1936 pro → ser, 2163 glu → gly, 2330 lys → glu, 2442 ile → val (この数はHCV-単離体 con1 のポリタンパク質のアミノ酸位置に関する、表1参照) を有することを特徴とする。

【0059】配列表に示される配列の個々の特性

20 配列番号: 1

名称: I389/Core-3' / wt

構造(ヌクレオチド位置):

1. 1~341: HCVの5' 非翻訳領域

2. 342~1193: HCVのコアタンパク質-ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ融合タンパク質; 選択可能なマーカー

3. 1202~1812: 脳心筋炎ウイルスの内部のリボソーム結合部位; その下流に位置するHCVオープンリーディングフレームの翻訳を可能にする

30 4. 1813~10842: コアから非構造タンパク質5BまでのHCVポリタンパク質

5. 1813~2385: HCVコアタンパク質; 構造タンパク質

6. 2386~2961: コートタンパク質1 (エンペロブタンパク質1); 構造タンパク質

7. 2962~4050: コートタンパク質2 (エンペロブタンパク質2); 構造タンパク質

8. 4051~4239: タンパク質p7

9. 4240~4890: 非構造タンパク質2 (NS2); HCVのNS2-3プロテアーゼ

10. 4891~6783: 非構造タンパク質3 (NS3); HCVのNS3プロテアーゼ/ヘリカーゼ

11. 6784~6945: 非構造タンパク質4A (NS4A); NS3プロテアーゼのコファクター

12. 6946~7728: 非構造タンパク質4B (NS4B)

13. 7729~9069: 非構造タンパク質5A (NS5A)

14. 9070~10842: 非構造タンパク質5B (NS5B); RNA依存性RNAポリメラーゼ

15. 10846~11076: HCVの3' 非翻訳領域

配列番号: 2

名称: I337/NS2-3' /wt

構造 (ヌクレオチド位置):

1. 1~341: HCVの5' 非翻訳領域
2. 342~1181: HCVのコアタンパク質-ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ融合タンパク質; 選択可能なマーカー
3. 1190~1800: 脳心筋炎ウイルスの内部のリボソーム結合部位; その下流に位置するHCVオープンリーディングフレームの翻訳を可能にする
4. 1801~8403: 非構造タンパク質2から非構造タンパク質5BまでのHCVポリタンパク質
5. 1801~2451: 非構造タンパク質2 (NS2); HCVのNS2-3プロテアーゼ
6. 2452~4344: 非構造タンパク質3 (NS3); HCVのNS3プロテアーゼ/ヘリカーゼ
7. 4345~4506: 非構造タンパク質4A (NS4A); NS3プロテアーゼのコファクター
8. 4507~5289: 非構造タンパク質4B (NS4B)
9. 5290~6630: 非構造タンパク質5A (NS5A)
10. 6631~8403: 非構造タンパク質5B (NS5B); RNA依存性RNAポリメラーゼ
11. 8407~8637: HCVの3' 非翻訳領域

配列番号: 3

名称: I389/NS3-3' /wt

構造 (ヌクレオチド位置)

1. 1~341: HCVの5' 非翻訳領域
2. 342~1193: HCVのコアタンパク質-ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ融合タンパク質; 選択可能なマーカー
3. 1202~1812: 脳心筋炎ウイルスの内部のリボソーム結合部位; その下流に位置するHCVオープンリーディングフレームの翻訳を可能にする
4. 1813~7767: 非構造タンパク質3から非構造タンパク質5BまでのHCVポリタンパク質
5. 1813~3708: 非構造タンパク質3 (NS3); HCVのNS3プロテアーゼ/ヘリカーゼ
6. 3709~3870: 非構造タンパク質4A (NS4A); NS3プロテアーゼのコファクター
7. 3871~4653: 非構造タンパク質4B (NS4B)
8. 4654~5994: 非構造タンパク質5A (NS5A)
9. 5995~7767: 非構造タンパク質5B (NS5B); RNA依存性RNAポリメラーゼ
10. 7771~8001: HCVの3' 非翻訳領域

配列番号: 4

名称: I337/NS3-3' /wt

構造 (ヌクレオチド位置)

1. 1~341: HCVの5' 非翻訳領域
2. 342~1181: HCVのコアタンパク質-ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ融合タンパク質; 選択可能なマーカー
3. 1190~1800: 脳心筋炎ウイルスの内部のリボソーム結合部位; その下流に位置するHCVオープンリーディングフレームの翻訳を可能にする
4. 1801~7758: 非構造タンパク質3から非構造タンパク質5BまでのHCVポリタンパク質
5. 1801~3696: 非構造タンパク質3 (NS3); HCVのNS3プロテアーゼ/ヘリカーゼ
6. 3697~3858: 非構造タンパク質4A (NS4A); NS3プロテアーゼのコファクター
7. 3859~4641: 非構造タンパク質4B (NS4B)
8. 4642~5982: 非構造タンパク質5A (NS5A)
9. 5983~7755: 非構造タンパク質5B (NS5B); RNA依存性RNAポリメラーゼ
10. 7759~7989: HCVの3' 非翻訳領域

配列番号: 5

名称: I389/NS2-3' /wt

構造 (ヌクレオチド位置)

1. 1~341: HCVの5' 非翻訳領域
2. 342~1193: HCVのコアタンパク質-ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ融合タンパク質; 選択可能なマーカー
3. 1202~1812: 脳心筋炎ウイルスの内部のリボソーム結合部位; その下流に位置するHCVオープンリーディングフレームの翻訳を可能にする
4. 1813~8418: 非構造タンパク質2から非構造タンパク質5BまでのHCVポリタンパク質
5. 1813~2463: 非構造タンパク質2 (NS2); HCVのNS2-3プロテアーゼ
6. 2464~4356: 非構造タンパク質3 (NS3); HCVのNS3プロテアーゼ/ヘリカーゼ
7. 4357~4518: 非構造タンパク質4A (NS4A); NS3プロテアーゼのコファクター
8. 4519~5301: 非構造タンパク質4B (NS4B)
9. 5302~6642: 非構造タンパク質5A (NS5A)
10. 6643~8415: 非構造タンパク質5B (NS5B); RNA依存性RNAポリメラーゼ
11. 8419~8649: HCVの3' 非翻訳領域

配列番号: 6

名称: I389/NS3-3' /9-13F

構造 (ヌクレオチド位置)

1. 1~341: HCVの5' 非翻訳領域
2. 342~1193: HCVのコアタンパク質-ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ融合タンパク質; 選択可能なマーカー
3. 1202~1812: 脳心筋炎ウイルスの内部のリボソーム結合部位; その下流に位置するHCVオープンリーディングフレームの翻訳を可能にする
4. 1813~7767: 細胞培養に適合した突然変異体9-13Fの非構造タンパク質3から非構造タンパク質5BまでのHCVポリタンパク質
5. 1813~3708: 非構造タンパク質3 (NS3); HCVのNS3プロテアーゼ/ヘリカーゼ
6. 3709~3870: 非構造タンパク質4A (NS4A); NS3プロテアーゼのコファクター
7. 3871~4653: 非構造タンパク質4B (NS4B)
8. 4654~5994: 非構造タンパク質5A (NS5A)
9. 5995~7767: 非構造タンパク質5B (NS5B); RNA依存性RNAポリメラーゼ
10. 7771~8001: HCVの3' 非翻訳領域

配列番号: 7

名称: I389/core-3' / 9-13F

構造 (ヌクレオチド位置)

1. 1~341: HCVの5' 非翻訳領域
2. 342~1193: HCVのコアタンパク質-ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ融合タンパク質; 選択可能なマーカー
3. 1202~1812: 脳心筋炎ウイルスの内部のリボソーム結合部位; その下流に位置するHCVオープンリーディングフレームの翻訳を可能にする
4. 1813~10842: 細胞培養に適合した突然変異体9-13Fのコアから非構造タンパク質5BまでのHCVポリタンパク質
5. 1813~2385: HCVコアタンパク質; 構造タンパク質
6. 2386~2961: コートタンパク質1 (エンペローブタンパク質1); 構造タンパク質
7. 2962~4050: コートタンパク質2 (エンペローブタンパク質2); 構造タンパク質
8. 4051~4239: タンパク質p7
9. 4240~4890: 非構造タンパク質2 (NS2); HCVのNS2-3プロテアーゼ
10. 4891~6783: 非構造タンパク質3 (NS3); HCVのNS3プロテアーゼ/ヘリカーゼ
11. 6784~6945: 非構造タンパク質4A (NS4A); NS3プロテアーゼのコファクター
12. 6946~7728: 非構造タンパク質4B (NS4B)

13. 7729~9069: 非構造タンパク質5A (NS5A)

14. 9070~10842: 非構造タンパク質5B (NS5B); RNA依存性RNAポリメラーゼ

15. 10846~11076: HCVの3' 非翻訳領域

配列番号: 8

名称: I389/NS3-3' / 5. 1

構造 (ヌクレオチド位置)

1. 1~341: HCVの5' 非翻訳領域
2. 342~1193: HCVのコアタンパク質-ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ融合タンパク質; 選択可能なマーカー
3. 1202~1812: 脳心筋炎ウイルスの内部のリボソーム結合部位; その下流に位置するHCVオープンリーディングフレームの翻訳を可能にする
4. 1813~7767: 細胞培養に適合した突然変異体5. 1の非構造タンパク質3から非構造タンパク質5BまでのHCVポリタンパク質
5. 1813~3708: 非構造タンパク質3 (NS3); HCVのNS3プロテアーゼ/ヘリカーゼ
6. 3709~3870: 非構造タンパク質4A (NS4A); NS3プロテアーゼのコファクター
7. 3871~4653: 非構造タンパク質4B (NS4B)
8. 4654~5994: 非構造タンパク質5A (NS5A)
9. 5995~7767: 非構造タンパク質5B (NS5B); RNA依存性RNAポリメラーゼ
10. 7771~8001: HCVの3' 非翻訳領域

配列番号: 9

名称: I389/core-3' / 5. 1

構造 (ヌクレオチド位置)

1. 1~341: HCVの5' 非翻訳領域
2. 342~1193: HCVのコアタンパク質-ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ融合タンパク質; 選択可能なマーカー
3. 1202~1812: 脳心筋炎ウイルスの内部のリボソーム結合部位; その下流に位置するHCVオープンリーディングフレームの翻訳を可能にする
4. 1813~10842: 細胞培養に適合した突然変異体5. 1のコアから非構造タンパク質5BまでのHCVポリタンパク質
5. 1813~2385: HCVコアタンパク質; 構造タンパク質
6. 2386~2961: コートタンパク質1 (エンペローブタンパク質1); 構造タンパク質
7. 2962~4050: コートタンパク質2 (エンペローブタンパク質2); 構造タンパク質
8. 4051~4239: タンパク質p7

9. 4240~4890: 非構造タンパク質2 (NS 2); HCVのNS2-3プロテアーゼ
10. 4891~6783: 非構造タンパク質3 (NS 3); HCVのNS3プロテアーゼ/ヘリカーゼ
11. 6784~6945: 非構造タンパク質4A (NS4A); NS3プロテアーゼのコファクター
12. 6946~7728: 非構造タンパク質4B (NS4B)
13. 7729~9069: 非構造タンパク質5A (NS5A)
14. 9070~10842: 非構造タンパク質5B (NS5B); RNA依存性RNAポリメラーゼ
15. 10846~11076: HCVの3' 非翻訳領域

配列番号: 10

名称: I389/NS3-3' /19

構造 (ヌクレオチド位置)

1. 1~341: HCVの5' 非翻訳領域
2. 342~1193: HCVのコアタンパク質-ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ融合タンパク質; 20
3. 1202~1812: 脳筋炎ウイルスの内部のリボソーム結合部位; その下流に位置するHCVオープンリーディングフレームの翻訳を可能にする
4. 1813~7767: 細胞培養に適合した突然変異体19の非構造タンパク質3から非構造タンパク質5BまでのHCVポリタンパク質
5. 1813~3708: 非構造タンパク質3 (NS 3); HCVのNS3プロテアーゼ/ヘリカーゼ
6. 3709~3870: 非構造タンパク質4A (NS 4A); NS3プロテアーゼのコファクター
7. 3871~4653: 非構造タンパク質4B (NS 4B)
8. 4654~5994: 非構造タンパク質5A (NS 5A)
9. 5995~7767: 非構造タンパク質5B (NS 5B); RNA依存性RNAポリメラーゼ
10. 7771~8001: HCVの3' 非翻訳領域

配列番号: 11

名称: I389/core-3' /19

構造 (ヌクレオチド位置)

1. 1~341: HCVの5' 非翻訳領域
2. 342~1193: HCVのコアタンパク質-ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ融合タンパク質; 選択可能なマーカー
3. 1202~1812: 脳筋炎ウイルスの内部のリボソーム結合部位; その下流に位置するHCVオープンリーディングフレームの翻訳を可能にする
4. 1813~10842: 細胞培養に適合した突然変異体19のコアから非構造タンパク質5BまでのHC 50

Vポリタンパク質

5. 1813~2385: HCVコアタンパク質; 構造タンパク質
6. 2386~2961: コートタンパク質1 (エンペローブタンパク質1); 構造タンパク質
7. 2962~4050: コートタンパク質2 (エンペローブタンパク質2); 構造タンパク質
8. 4051~4239: タンパク質p7
9. 4240~4890: 非構造タンパク質2 (NS 2); HCVのNS2-3プロテアーゼ
10. 4891~6783: 非構造タンパク質3 (NS 3); HCVのNS3プロテアーゼ/ヘリカーゼ
11. 6784~6945: 非構造タンパク質4A (NS4A); NS3プロテアーゼのコファクター
12. 6946~7728: 非構造タンパク質4B (NS4B)
13. 7729~9069: 非構造タンパク質5A (NS5A)
14. 9070~10842: 非構造タンパク質5B (NS5B); RNA依存性RNAポリメラーゼ
15. 10846~11076: HCVの3' 非翻訳領域

本発明を以下に実施例ならびにそれに付属する表および図に基づいて詳細に説明する。挙げられる図は以下のことを示す。

【0060】図1A: 本発明によるHCV-RNA-構築物の構造

一番上に、完全な親HCVゲノムの構造の略図をポリタンパク質内の分割産物コア、E1、E2、p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5AおよびNS5Bのための遺伝子の位置、ならびに5' および3' 非翻訳領域 (5' NTRおよび3' NTR) (水平のバーとして示した)、およびサブゲノム構築物の製造のために選択される両方の位置、すなわちNS5B RNAポリメラーゼの“GDD触媒ドメイン”の位置 (GDD) およびHCV-IRESの3' 境界部の位置 (ヌクレオチド位置1~377もしくは1~389) (ゲノム略図の上方に示した) と一緒に与えた。ゲノム略図の下方の数字は相当するヌクレオチド位置を示している。

40 【0061】前記略図の下に、5' HCV-IRES、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (Neo^r)、EMCV-IRES (E-I) およびNS2もしくはNS3から確かな3' 末端までのHCV配列からなる本発明による2つの改変したHCV-RNA構築物 (サブゲノム) の略図を示している。NS5BポリメラーゼGDDモチーフを含む10アミノ酸の欠失位置をそれぞれ三角形 (Δ) で印す。

【0062】図1B: トランスフェクションして継代培養されたHu h-7細胞クローンにおける複製されたプラス鎖RNAの検出のための変性ホルムアルデヒドア

ガロースゲル電気泳動の結果

HCV特異的RNAの位置(矢印)および28S rRNAの位置をレーン12の右側に示し、RNAマーカー(M)のサイズ(ヌクレオチド数)をレーン1の左側に示した。

【0063】図1C: 選択された大部分の細胞クローンにおいて導入されたレプリコンDNAが存在しないことを証明するための引き続きのサザンブロットによるPCR試験の結果

レーン1およびレーン2はポジティブコントロールを示し、レーン13はネガティブコントロールを示している。レーン1の左に示された数字はヌクレオチドマーカー分子のサイズを明示している。

【0064】図2A: HCV-RNA構築物を有する細胞クローン(9-13)における導入されたレプリコンDNA(プラスミド分子I₃₇₇/NS3-3'/wt)の高感度の排除のための引き続きのサザンブロットによるPCR試験の結果

レーン7~レーン11は細胞クローン9-13の全DNAを添加しない構築物I₃₇₇/NS3-3'/wtのDNA分子の検量の結果を表し、かつレーン2~レーン6はPCR前にその都度1μgの9-13 DNAを添加した(DNA調製におけるPCRのインヒビターの排除のため)同一のプラスミド分子を表す。レーン13はネガティブコントロール(DNAプローブ無しでのPCR)を表す。レーン1は細胞クローン9-13の全DNA 1μgを使用して得られた結果を示している。

【0065】図2B: HCVのプラス鎖RNAおよびマイナス鎖RNAの定量のためのノーザンブロット試験の結果

矢印はレプリコンRNAの位置を印している。“プラス”および“マイナス”の移行はゲル上に載せられたRNAコントロールの正(プラス)の極性もしくは負(マイナス)の極性を表す。“マイナス鎖”および“プラス鎖”は放射性RNAプローブの特異性を表す。

【0066】図2C: HCV-RNA複製のダクチノマイシンに対する耐性を証明するための細胞内で複製されたHCV-RNAの放射性標識後のホルムアルデヒドアガロースゲル電気泳動の結果

図3A: 代謝放射性標識後の免疫沈降による選択された細胞クローンにおけるHCV特異抗原の検出

レーン7~レーン9は確かなサイズマーカー(Huh-7細胞中でのHCV-RNA構築物の一過性発現後に得られた)を表し、同定されたHCVタンパク質はレーン1の左端に印し、分子量(キロダルトン)はレーン9の右側に示した。

【0067】図3B: HCV抗原の細胞内での所在の検出のための免疫蛍光試験の結果

図4: 5' HCV-IRES、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子(Neo^r)、異種の、例えば脳

心筋炎ウイルスのIRES-エレメント(E-I)、完全なHCV読み枠および確実な3' NTRからなる、本発明による選択可能なHCV-RNA構築物(完全なゲノム)の構造の略図

図5: ポリタンパク質をコードするヌクレオチド配列内に挿入された抗生物質耐性遺伝子(単シストロン性RNA)(A)および3' NTR内に挿入された抗生物質耐性遺伝子(2シストロン性RNA)(B)を有するHCV-RNA構築物の構造の略図

図6: NS3からNS5BまでのHCVレプリコンの一部として挿入されたリポーター遺伝子を有するHCV-RNA構築物の構造(A)(そのリポータータンパク質は最終的にはウイルスまたは細胞のプロテアーゼによってポリタンパク質から分離され、かつ選択可能なマーカー遺伝子(選択遺伝子)もしくは耐性遺伝子は同時トランスフェクションによって細胞中に導入される)、耐性遺伝子およびリポーター遺伝子(例えばネオマイシンホスホトランスフェラーゼおよび緑色蛍光タンパク質のための遺伝子)からなる融合遺伝子の一部として挿入されたリポーター遺伝子を有するHCV-RNA構築物の構造(B)、耐性遺伝子およびリポーター遺伝子(例えばネオマイシンホスホトランスフェラーゼおよび緑色蛍光タンパク質のための遺伝子)からなるレプリコンの一部として挿入されたリポーター遺伝子を有するHCV-RNA構築物の構造(C)(これらはプロテアーゼによって分解できるかまたは自己分解(自己触媒)活性を有するアミノ酸配列(斜線の範囲)をコードするヌクレオチド配列中を介して結合している)、自体の内部のリボソーム結合部位(IRES)から発現される独立の遺伝子(ここでは緑色蛍光タンパク質)として挿入されたリポーター遺伝子を有するHCV-RNA構築物の構造

(D)(耐性遺伝子(ここではネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子)は自体の内部のリボソーム結合部位(IRES)から独立して同様に発現される)(複シストロン性構築物)の略図

図7: 耐性遺伝子がリボザイムもしくはリボザイムのための認識部位を介してHCV-RNA配列と結合しているHCV-RNA構築物の構造の略図太い線はHCVの5' および3' のNTRを意味し、E-Iは耐性遺伝子の発現のために必須の異種の内部リボソーム結合部位であり、灰色の正方形はリボザイムもしくはリボザイムの認識部位を意味する。

【0068】図8: 耐性遺伝子および組み込まれた外来遺伝子を有するHCV-RNA構築物の構造の略図

図9: 全RNAとインビトロ転写物との比感染力(形成した細胞コロニーの数として示した)の比較のための方法プロセス

HCV-RNAを相応のRNA構築物のインビトロ転写によって製造し、260nmでの光学密度(OD₂₆₀)の測定によって定量した。これらの分子の規定さ

れた数をナイーヴHu h-7細胞の全RNAの一定量と混合し、かつこれらの混合物をエレクトロポレーションを使用してナイーヴHu h-7細胞中に導入した。それに並行して、図1に記載される方法によって製造された細胞クローンの全RNAを従来の技術において公知の方法で単離し、かつそれに含有されるHCV-RNAの量をHCV特異的なRNAプローブを使用するノーザンブロットおよび引き続きのホスホイメージャー (Phosphorimager) による定量によって決定する。全RNAの規定された量をインビトロ転写物と類似にネイティブなHu h-7細胞中にトランスフェクションさせた。次いで両方のバッチ中の細胞はG418選択を実施し、かつ形成したコロニーの数を、固定およびクーマシーブリリアントブルーでの染色の後に計数することによって決定した。トランスフェクション効率の決定のために、各トランスフェクションバッチにルシフェラーゼの発現を可能にするプラスミド1μgを添加した。トランスフェクションした細胞のアリコートを24時間後に収穫し、かつ各細胞溶解物中のルシフェラーゼ活性を決定した。コロニーの数はその都度ルシフェラーゼ発現に基づいて規格化した。

【0069】図10：9-13クローンの配列分析
HCV-RNA構築物I377/NS3-3'のトランスフェクションによって生じる細胞クローン9-13の全RNAを従来の技術において公知の方法を使用して単離し、かつヌクレオチド位置59~9386までのHCV-RNA構築物を“長距離RT-PCR (long-distance RT-PCR)”を使用してプライマーS59およびA9413の使用下に増幅させた。PCR断片をクローニングし、かつ11個のクローン(9-13A~Kと呼ぶ)を完全に配列決定し、その際、クローンDおよびクローンI、クローンEおよびクローンGならびにクローンHおよびクローンJは同一であると証明された。再クローニングされたHCV-RNAと親構築物の間のNS3-5B領域におけるアミノ酸差異の位置はそれぞれのクローンにおいて太い垂線で印した。各クローンを制限酵素SfiIで消化し、かつそれぞれの断片を親構築物に挿入した。これらのクローンをそれぞれのHu h-7細胞にトランスフェクションし、該細胞を図1に記載のように選択した。各構築物によって得られる細胞クローンの数は各構築物の右隣に印した。

【0070】図11A：リポーター遺伝子の使用による複製アッセイの原理
この図の上方部分においては、HCV5' NTR (ヌクレオチド位置1~389)、ルシフェラーゼ遺伝子(1uc)、脳筋炎ウイルスのIRES、HCVNS3-5Bおよび3' NTRからなるHCV-DNA構築物I389/Luc/NS3-3'が示されている。不活性化

能力のあるHCV-RNA構築物もしくは欠失HCV-RNA構築物をコードするプラスミドをScaIで消化し、かつT7RNAポリメラーゼによるインビトロ転写において使用した。鋳型DNAの除去後に、それぞれのHCV-RNA構築物をエレクトロポレーションによってナイーヴHu h-7細胞中に導入し、これらを規則的な間隔で収穫した。

【0071】図11B：親HCV-RNA構築物I389/Luc/NS3-3'/wt(wt)または以下の変異体：不活性RNA(318DN)、変異体9-13Fもしくは変異体5.1でトランスフェクションした細胞におけるルシフェラーゼ活性の比較

細胞を、トランスフェクション後の6時間(示されていない)、24時間、48時間、72時間、96時間、120時間、144時間および168時間に収穫し、かつルシフェラーゼ活性を発光測定的に決定した。

【0072】図12：選択可能なHCV全長ゲノム(構築物I389/core-3'/5.1およびI389/core-3'/9-13F)

(A) 全長構築物の略図。制限酵素SfiIのための2つの示される認識部位間の範囲は高度に適合したRNA変異体5.1または9-13Fの配列に相当する。

【0073】(B) Aに示される構築物I389/core-3'/5.1のインビトロ転写されたRNA各0.1μgでHUH7細胞にトランスフェクションした後に得られるコロニーの数。代表的な試験の結果を挙げている。

【0074】(C) 相応のインビトロ転写物のトランスフェクション後に得られるG418耐性細胞クローンにおける自律的に複製されるHCV全長RNAの検出。図はneo耐性遺伝子およびHCV5' NTRに対するプローブとハイブリダイズしたノーザンブロットのオートラジオグラムを示している。レーン1およびレーン2に示されるコントロールは、ナイーヴHu h-7細胞からの全RNAと混合された挙げられるインビトロ転写物の各10⁸分子に相当する。ネガティブコントロールはナイーヴHu h-7細胞(レーン3)からの全RNAを専ら有している。レーン4~9は、インビトロ転写されたI389/core-3'/5.1-RNAもしくはI389/core-3'/9-13F-RNAでトランスフェクションした後に得られたG418耐性細胞クローンからの全RNA3~10μgを含有している。選択のために使用されるG418濃度をその都度挙げている。示される5個の細胞クローンは高度に適合したRNA変異体5.1(レーン4~8)を有し、1個の細胞クローンは適合したRNA変異体9-13F(レーン9)を有している。

【0075】図13：1つのリポーター遺伝子を有するHCV-RNA構築物。(A) 2シストロン性HCV-RNA構築物。リポーター遺伝子を別々のIRESを使

用して翻訳した。(B) 単シストロン性HCV-RNA構築物。リポーター遺伝子産物をHCVタンパク質との融合タンパク質として発現させた。2つの成分をウイルスのプロテアーゼもしくは細胞のプロテアーゼのための融合された2つのタンパク質成分のタンパク質分解による分離を可能にする認識配列を介して結合させる。示される例ではリポーター遺伝子産物およびそれぞれのHCVタンパク質をユビキチン(Ub)のための認識配列を介して融合させた。

【0076】図14: 耐性遺伝子に付加的に、挿入された外来遺伝子を有している3シストロン性のHCV-全長RNA構築物。

【0077】図15: 耐性遺伝子がHCV成分を有する融合タンパク質として発現する単シストロン性HCV-RNA構築物。耐性遺伝子(RG)は融合タンパク質として活性であるか、または該遺伝子を、耐性遺伝子産物がHCV成分の細胞性もしくはウイルス性のプロテアーゼによって分解されるように、HCV成分を有するタンパク質分解可能な配列と融合する。示される例では、耐性遺伝子を、ユビキチン(Ub)をコードする配列を介してそれぞれのHCV成分と融合させた。

【0078】

【実施例】例1: HCV-RNA-構築物の製造

(A) RT-PCRを用いた完全HCV-コンセンサスゲノムの合成およびクローニング

慢性に感染した患者の肝臓から、HCV-ゲノム、つまりHCV-RNAを以下の通りに単離した: 肝臓約100mgからChomczynskiおよびSacchi(1987, Anal. Biochem. 162, 15)の方法により完全RNAを単離した。単離したこのRNA1μgを用いて、プライマーA6103 (GCTATCAGCCGGTTCATCCACTGC) またはA9413 (CAGGATGGCCTATTGGCCTGGAG) を有し、かつエキスパンドリバーストランスクリプターゼ(expand reverse transcriptase)システム(Boehringer Mannheim、ドイツ)を用いた逆転写を製造元の指示に従って実施した。この逆転写(RT)生成物を用いて、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR=polymerase chain reaction)を、エキスパンドロングテンプレート(expand long template)システム(Boehringer Mannheim、ドイツ)の使用下で実施し、その際、ジメチルスルホキシド2%の含有率を有する緩衝液を使用した。42℃で1時間の後、この反応バッチの1/8を、プライマーA6103およびS59 (TGTC TTCACGCAGAAAGCGTCTAG)、またはA9413およびS4542 (GATGAGCTCGCCGCGAAGCTGTCC) とともに第一のPCRのサイクルにおいて使用した。40サイクル後に、この反応バッチの1/10を、プライマーS59およびA4919 (AGCACAGCCCCGCGTTCATAGCAC TCG)、またはS4542およびA9386 (TTA

GCTCCCCGTTTCATCGGTTGG) とともに第二のPCRのサイクルにおいて使用した。30サイクル後に分離用アガロースゲル電気泳動を用いてPCR生成物を精製し、かつその際に溶離した断片をベクターpCR2.1 (Invitrogen) またはpBSKII (Stratagene) 中でライゲーションした。それぞれの断片からの4つのクローンを分析し、かつ配列決定し、かつコンセンサス配列を確認した。この目的のためにDNA配列を相互に比較した。断片の1つの配列が残りのものと異なる位置を、不所望の突然変異と見なした。配列が多義性である場合、該当する領域の自体オーバーラップしている比較的短いPCR断片を増幅し、かつ複数のクローンを配列決定した。このようにしてそれぞれの断片中の数多くの潜在的な突然変異を同定し、ひいては単離物-特異的なコンセンサス配列を確定することができた。確定されたこのコンセンサス配列もしくはこのゲノムは、世界的に普及している遺伝子型1bに属する。3'末端における翻訳されなかった領域(=3' NTR)が通常のPCRにより得られ、その際、従来技術において公知の「X-テール(X-tails)」(Tanaka et al., 1995, Biochem. Biophys. Res. Commun. 215, 744およびRice, PCT/US96/14033)の最後の24のヌクレオチドを覆うアンチセンスプライマーを使用した。PCRを用いてT7プロモーターの鎖の下流の5'-末端(=5' NTR)における確立された非翻訳領域を発生させ、その際、一方では短縮したT7プロモーター(TAATACGAC TCA CTA TAG)およびHCVの第一の88のヌクレオチドに相当するオリゴヌクレオチドを使用し、かつ他方ではゲノムの5'断片の1つを有する前記のプラスミドを使用した。非コンセンサス交換の数が極めて少ないサブゲノム断片から、完全HCV-コンセンサスゲノムを構成し、かつ改変したpBR322-ベクターに挿入した。部位特異的な突然変異(site-directed mutagenesis)を用いてコンセンサス配列からの差異を排除した。確定された3'末端を有する「ラン-オフ(run-off)」転写を製造するために、単離物の3'-NTR(末端TGTを有する)をAGTに変性し(Kolykhalov et al., 1996, J. Virol. 70, 3363による遺伝子型3=クローン' WS'の配列による)、かつさらに付加的なヌクレオチド交換を位置9562において行い、AT塩基対を3' NTR(Kolykhalov et al., ibid.)の3'末端におけるヘアピン構造中に保持した。酵素Scalのための内部の制限部位を排除するために、さらにいわゆる発現しない(silent)ヌクレオチド交換を行った。適合した5' NTRおよび3' NTRを有する全長のゲノムの連結後に、完全HCV配列を調査した。その際、不所望のヌクレオチド交換は発見されなかった。

【0079】このようにして製造したHCVゲノムは、定義によれば向肝性(hepatotrop)であるべきである。

【0080】(B) 選択可能なHCV-サブゲノム構築物の合成

(A) に記載したコンセンサスゲノムの使用下に、抗生物質耐性遺伝子のネオマイシン-ホスホトランスフェラーゼ (NPT) および内部のリボソーム結合部位 (IRES) の2つの配列を有するHCV-サブゲノム構築物を製造した。このために使用した生化学的なプロセス技術は、当業者に公知であり、かつ周知である(次の文献を参照のこと: Sambrook, J., E.F. Fritsch, T. Maniatis, 1989, Molecularcloning: a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.; Ausubel et al. (eds.), 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1-3, John Wiley & Sons Inc., New York)。抗生物質耐性遺伝子を直接5' NTRの後ろに挿入し、このことにより2シストロンのRNAが得られた(図1Aを参照のこと)。しかしまた抗生物質耐性遺伝子はHCV-サブゲノム構築物の別の部位、例えばポリタンパク質をコードするヌクレオチド配列の内部にもまた同様に良好に挿入することができ、このことにより単シストロンのRNAが得られる(図5Aを参照のこと)か、または3' NTR中に挿入する(図5Bを参照のこと)。IRES-エレメントは一方では両方のHCV-IRES-変異体ヌクレオチド1-377またはヌクレオチド1-389の1つであり、かつ他方ではNS2またはNS3に関する遺伝子の鎖の下流にゲノムの確かな3' 末端までHCV配列の翻訳を制御するエンゼファロマイオカルディティス(Encephalomyocarditis)ウイルスのIRESである。

【0081】前記の両方のHCV-IRES-変異体を以下の通りに確認した: HCV-IRESの3' 境界部の欠失分析法(Reynolds et al., 1995, EMBOJ. 14, 6010)に基づいて、5' NTRの種々の断片をNPT遺伝子と融合し、かつT7 RNAポリメラーゼ遺伝子を含む有しているプラスミドとの同時トランスフェクションに基づいて、形成されたコロニーの最大数に関して分析した。1-377および1-389のHCV配列で最良の結果が得られた。HCVポリタンパク質のAUG出発コードは位置342に存在し、ひいてはIRES配列中に含有されているので、HCV-カプシドタンパク質(コアタンパク質(Core-Proteins))の12個もしくは16個のアミノ酸とネオマイシンホスホトランスフェラーゼとが融合する(図1Aを参照のこと)。

【0082】従ってこの改変されたHCV-サブゲノム構築物は名称I₃₇₇/NS2-3' (またはI₃₇₇/NS3-3') およびI₃₈₉/NS2-3' (またはI₃₈₉/NS3-3') を有していた。これらは図1Aに図示されている。

【0083】これらの改変された親HCV-サブゲノム構築物I₃₇₇/NS2-3' (またはI₃₇₇/NS3-

3') およびI₃₈₉/NS2-3' (またはI₃₈₉/NS3-3') のインビトロ転写を用いて、ヒトの肝細胞の種々の細胞系および一次細胞培養をトランスフェクションした。

【0084】すべてのトランスフェクション実験に並行するネガティブコントロールとして、それぞれの改変親HCV-サブゲノム構築物に対して、1つの相応して改変したが、しかしサブゲノムは読み枠中で、NS5B

RNAポリメラーゼの活性中心を含む10個のアミノ酸の欠失を有していることにより親サブゲノムから区別される欠損サブゲノムを構成した(Behrens et al., 1996, EMBO J. 15, 12;およびLohmann et al., 1997, J. Virol. 71, 8416)。

【0085】(C) 選択可能なHCV-ゲノム構築物の合成

5' 末端でルシフェラーゼ遺伝子の断片および完全EMCV-IRESと結合しているNS2-3' サブゲノム構築物を、NcoIおよびSpeIで制限し、かつ分離用アガロースゲル電気泳動を用いて精製した。このようにして得られたベクターを3ファクターライゲーションにおいて、NcoI/NotI-HCV-断片を用いてHCV-ゲノムのヌクレオチド位置342~1968に相応して、およびNotI/SpeI-断片を用いてヌクレオチド位置1968~9605に相応してライゲーションした。その後、完全HCV-読み枠および3' NTRがルシフェラーゼ遺伝子断片およびEMCV-IRESの下流に存在している得られた構築物を、PmeIおよびSpeIで制限し、かつ同様に制限したI₃₈₉/NS3-3' /wt-サブゲノム構築物ベクターを用いてライゲーションした。選択可能なこのHCV-ゲノム構築物が図4に記載されている。

【0086】(D) HCV-RNA-構築物に相応したインビトロ転写物の製造

前記の精製したプラスミドDNAを、ScaIを用いて直線状にし、かつフェノール/クロロホルム抽出およびイソプロパノール沈殿後に次の成分の使用下にインビトロ転写反応で使した: HEPES 80mM, pH 7.5, MgCl₂ 12.5mM, スペルミジン 2mM, ジチオトレイトール 40mM, それぞれのNTP から2mM, RNasin 1ユニット/μl, 制限DNA 50μg/mlおよびT7 RNAポリメラーゼ約2ユニット/μl。37°Cで2時間後にT7ポリメラーゼの半量を添加し、かつ反応バッチをさらに2時間インキュベーションした。DNAの除去のために、該混合物を酸性フェノールで抽出し(U. Kedzierski, J.C. Porté, 1991, Bio Techniques 10, 210)、イソプロパノールで沈殿し、ペレットを水中に溶解し、かつDNase (DNA μgあたり2ユニット)とともに37°Cで60分間インキュベーションした。酸性フェノール、酸性フェノール/クロロホルムおよびクロロホルムを用いたそ

の後の抽出およびイソプロパノール沈殿の後、溶解したRNAを光学密度測定により定量化し、かつその不確定性をホルムアルデヒド-アガロースゲル電気泳動により調査した。

【0087】例2：肝癌細胞系Hu h-7を用いたトランスフェクション実験

すべてのトランスフェクション実験において、それぞれの鋳型DNAをあらかじめ除去して、該DNAがトランスフェクションした細胞に導入され、かつHCVの複製とは無関係にこれらにネオマイシン耐性を媒介することができるということを回避することに慎重に注意を払った。従ってインビトロ転写(例1D)に引き続き、DNA μ gあたり、DNase 2ユニットを用いて反応混合物を37°Cで60分間処理し、かつ酸性フェノール、酸性フェノール/クロロホルムおよびクロロホルムを用いて抽出した。トランスフェクションのための使用前に、ホルムアルデヒド-アガロースゲル電気泳動を用いて沈殿したRNAを分析した。

【0088】高度に分化したヒト肝癌細胞系Hu h-7を用いて3つの別々のトランスフェクション実験を実施した(Nakabayashi et al., 1982, Cancer Res. 42, 3858)。その際、エレクトロポレーションを用いてその都度RNA 15 μ gを 8×10^6 Hu h-7細胞中に導入し、かつこれらの細胞を引き続き直径10cmの培養皿に播種した。播種の24時間後に、ネオマイシン(=G418)を最終濃度1mg/mlで添加した。培地を週に2回交換した。3~5週間後に小さいコロニーが認識され、これを単離し、かつ同一の培養条件下で継代した。

【0089】第一の実験の経過において得られた細胞クローンを単離し、かつ継代培養した。この手順においてほとんどのクローンが死滅し、かつ最終収率は親HCVサブゲノム構築物でトランスフェクションされていた細胞クローンがわずか9および欠損HCV-ゲノム構築物、つまり欠損NS2-3' HCV-RNAでトランスフェクションされていた細胞クローン1(クローン8-1)であった。短縮された増殖時間および不規則に形成された細胞が時折出現すること以外に、これらの9の細胞クローンと1の細胞クローン(クローン8-1)又は親Hu h-7細胞の間には安定した形態学的な相違は見られなかった。

【0090】機能性HCV-ゲノム構築物に関する主な基準は、正確な大きさを有するウイルスRNAの形成およびG418耐性を転写されたか、もしくは媒介された可能性のある(組み込まれた)プラスミドDNAの不在である。

【0091】Hu h-7細胞中でHCV-RNAを決定するために、全RNAを単離し、かつ慣用のノーザンブロット法を用いてプラス鎖-特異的なリボプローブ(Ribosonde)(RNA-プローブ)の使用下に分析した。

このためにChomczynskiおよびSacci, 1987, Anal. Biochem. 162, 156の方法によりそれぞれの細胞クローンから全RNAを単離し、変性ホルムアルデヒド-アガロースゲル電気泳動法を用いて全RNA含有率0.5~1 $\times 10^6$ 細胞に相当するRNA 10 μ gを分離した(図1Bのレーン3~12)。確かな配列を有するサイズマーカーとして、I₃₈₉/NS2-3'/wtまたはI₃₈₉/NS3-3'/wtレプリコンRNAに相応する10⁹のインビトロ複写を同時に分離した(レーン1もしくはレーン2)。分離したRNAをナイロンメンブランに移し、かつヌクレオチド377~ヌクレオチド1の完全NPT-遺伝子およびHCV-IRESに対して相補性に放射性標識したプラス鎖-特異的なRNA-プローブを用いてハイブリダイゼーションした。HCV-特異的なRNA(矢印)および28SrRNAの位置は、レーン12の右側に記載されており、RNAマーカーの大きさ(ヌクレオチドの数)は、レーン1の左側に記載されている。RNAマーカーの断片は、HCV配列を有しており、かつ従ってリボプローブとハイブリダイゼーションする。この分析の結果は図1Bに記載されている。

【0092】欠損HCV-ゲノム構築物を用いてトランスフェクションしたクローン8-1を例外として、すべての細胞クローンは正確な長さの均質なHCV-RNAを産出した(NS2-3'の場合、約8640のヌクレオチドおよびNS3-3'レプリコンの場合、約7970のヌクレオチド)。この調査は、機能性レプリコンもしくは機能性HCV-ゲノム構築物が、G418耐性を転写するということの指標である。G418耐性が、Hu h-7宿主細胞のゲノムに組み込まれており、かつ細胞プロモーターのコントロール下で転写されるプラスミドDNAに起因するということを排除するために、NPT遺伝子特異的なPCRを用いてそれぞれのクローンからDNAを調査した。この場合、選択されたHu h-7細胞クローンから、10mM Tris, pH 7.5, 1mM EDTA, 0.5% SDS中のプロテインキナーゼK(40 μ g/ml, 1h, 37°C)を用いた消化および引き続きフェノール、フェノール/クロロホルムを用いた抽出およびイソプロパノール沈殿によりDNAを単離した。DNA沈殿物を10mM Tris(pH 7.5)および1mM EDTA中に溶解し、かつRnase Aを用いて1時間インキュベーションした。フェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿に引き続き、4~8 $\times 10^4$ 細胞に相応するDNA 1 μ gを、NPT-遺伝子-特異的なプライマー(5'-TCAAGACCGACCTG TCCGGTGGCC-3'および5'-CTTGAGCCTGGCGAACAGTTCGGC-3')の使用下にPCRを用いて分析し、かつ379のヌクレオチドからなるDNA断片が得られた。PCR生成物の特異性をサザンブロット法を用いて検出し、その際、NPT遺伝子に相応するジゴキ

シグニン標識したDNA断片を使用した。ポジティブコントロールとして、 10^7 のプラスミド分子またはネオマイシン耐性遺伝子を用いて安定にトランスフェクションされたBHK細胞系からのDNA $1 \mu\text{g}$ を用いてPCR法を実施し、かつネガティブコントロールとして、同一であるがしかしDNAを添加しなかった反応試薬を用いてPCRを実施した。

【0093】この調査の結果は図1Cに記載されている。レーン1および2は、ポジティブコントロールを表し、レーン13は、ネガティブコントロールを表す。レーン1の左側の数の表示は、ヌクレオチドマーカ分子の大きさを表している。NS2-3' レプリコン/NS2-3' HCV-ゲノム構築物を用いたトランスフェクションによる細胞に由来するクローン7-3 (図1C、レーン3) 中、および欠損HCV-ゲノム構築物を用いたトランスフェクションによる細胞に由来するクローン8-1 (図1C、レーン12) 中以外には、いずれの細胞クローンでもNPT-DNAを検出できなかった。この調査は、ほとんどのクローンのG418耐性が複製されたHCV-RNAにより媒介されたということのためのさらなる指標である。しかしこの結果とは無関係に、正確な大きさを有するHCV-RNAを組み込まれたプラスミドDNAから製造することはあり得ない。というのもインビトロ転写のために使用されるプラスミドは、真核生物プロモーターもポリアデニル化シグナルも有していないからである。従ってクローン7-3の場合、耐性はおそらくHCV-RNA構築物もしくは複製するHCV-RNAによっても、組み込まれたNPT DNA配列によっても媒介される可能性は極めて高く、その一方でクローン8-1の細胞の耐性はもっぱら導入されたプラスミドDNAに起因する。

【0094】G418耐性が自律的に複製するHCV-RNAにより媒介されていることを証明するためにクローン9-13 (図1B、レーン11) をさらに試験した。NPT-遺伝子の導入されたコピーを有するクローン8-1をあらゆるところでネガティブコントロールとして使用した。クローン9-13中のNPT-DNAの存在を徹底的に排除するという目的で、4000以下の細胞中のNPT-遺伝子コピー1000未満の検出を可能にするPCRを実施した。このPCRの結果は図2Aに記載されている。このPCRの場合、詳細には以下の通りに行った：その都度 $10^6 \sim 10^2$ のプラスミド分子 (I_{377} / NS3-3' / wt) を、直接 (レーン7~11) またはその都度 $1 \mu\text{g}$ の9-13 DNAの添加後 (レーン2~6) に試験で使用した。増幅したDNA断片の特異性を、NPT-特異的なプローブの使用下にサザンブロットを用いて決定した。DNA-プローブを有していないPCRを、ネガティブコントロールとして実施した (レーン12)。

【0095】この高感度な方法を用いても細胞クローン

9-13のDNA μg 中にプラスミドDNAは検出されなかった (レーン1)。これらの細胞中のHCV-プラス鎖およびマイナス鎖のRNAの量を評価するために、プラス鎖およびマイナス鎖特異的な放射性標識したリボプローブ (Ribosonde) (=RNAプローブ) の使用下にノーザンブロット法を用いて全RNAの希釈系列を分析した。このために、その都度、細胞クローン9-13および8-1から単離された全RNA $8 \mu\text{g}$ 、 $4 \mu\text{g}$ または $2 \mu\text{g}$ を、ノーザンブロット法で公知量のプラス鎖またはマイナス鎖極性 (コントロールRNA) を有する類似のインビトロ転写と並行して分析し、かつ引き続きハイブリダイゼーションした。ハイブリダイゼーションは、完全NPT遺伝子およびHCV-IRESを覆うプラス鎖特異的なリボプローブ (上部の図版の「プラス鎖」) を用いるか、またはNS3配列に対して相補的なマイナス鎖特異的なRNAプローブ (下部の図版の「マイナス鎖」) を用いて実施した。矢印はレプリコンRNAの位置を標識している。この分析の結果は図2Bに記載されている。

【0096】プラス鎖の場合、約 10^8 コピー/全RNA μg が検出され、これは細胞あたり1000~5000のHCV-RNA分子に相当するが、その一方でマイナス鎖RNAの量は5~10倍低かった。この結果は、マイナス鎖RNAは、プラス鎖分子の合成のための装入物として使用される複製中間体もしくは中間コピーであるという仮定と一致する。

【0097】反応は実質的にウイルスRNAに依存したRNAポリメラーゼにより触媒されるので、HCV-RNAの合成は、DNA鋳型からのRNA合成を選択的に抑制するが、しかしRNA鋳型からのRNA合成を抑制しない抗生物質であるダクチノマイシンに対して耐性であるべきである。この推測を裏付けるために、 $[^3\text{H}]$ ウリジンをを用いて細胞をダクチノマイシンの存在下でインキュベーションし、放射性標識したRNAを抽出し、変性アガロースゲル電気泳動を用いて分離し、かつ $[^3\text{H}]$ 感光板の使用下に市販のバイオイメージャー (Bio-Imager) を用いて分析した。このためにその都度、クローン9-13および8-1の細胞約 5×10^5 をC i $[^3\text{H}]$ ウリジン 100μ を用いてダクチノマイシン (Dac t) の不在下 (-) または $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ の存在下 (+) に16時間インキュベーションした。この標識反応に引き続き、全RNAを調整し、かつホルムアルデヒドアガロースゲル電気泳動を用いて分析した。両方の第一のレーン中で、全RNAの1/10が表示されているのみである。放射性標識したRNAを、BAS-2500バイオイメージャー (フジ(Fuji)社) を用いて目視できるようにした。

【0098】この分析の結果は図2Cに記載されている。NS5Bポリメラーゼのインヒビタープロフィールとの一致において (Behrens et al., 1996, EMBOJ. 15,

12およびLohmann et al., 1997, J. Virol. 71, 841 6)、HCV RNAの複製はダクチノマイシンにより影響を受けることはないが、その一方で細胞RNAの合成は抑制された。ウイルスRNAの同一性を確認するために、複製した配列の再クローニングのためにRT-PCRを実施した。再クローニングしたRNAの配列分析は、クローン9-13中のRNAがHCV-特異的であり、かつHCV-構築物I₃₇₇/NS3-3'/wtの転写した転写物と一致することを示した。

【0099】ウイルスタンパク質の分析のために該当する細胞をまず代謝的に [³⁵S] メチオニン/システインを用いて放射性に標識し、引き続き溶解し、かつその後、免疫沈降を用いてHCV特異的なタンパク質を細胞-溶解産物から単離した。この分析の結果は図3Aに記載されている。その際、詳細には以下の通りに行った：細胞クローン9-13 (wt) および8-1 (Δ) の細胞を、当業者に公知であり、かつ市販のタンパク質標識混合物 (例えばNEN Life Science) を用いて16時間処理することにより代謝的に放射性標識した。非変性条件下 (例えばBartenschlager et al., 1995, J. Virol. 69, 7519による) または3つの異なった抗血清の使用下 (3/4, 5A, 5B, レーン1~12の上部の末端における標識による) に免疫沈降 (IP) を用いて、HCV特異タンパク質を細胞-溶解産物から分離した。トリシンSDS-PAGEを用いて免疫複合体を分析し、かつオートラジオグラフ法を用いて目視できるようにした。確定された大きさのマーカを得るために、相同レプリコン構築物I₃₇₇/NS3-3'/wtをワクシニアウイルスT7-ハイブリッド系を用いてHu h-7細胞中で一過性発現させた。その際に得られた生成物をサイズマーカー (レーン7~9) として、クローン9-13および8-1の細胞と並行して処理した。同定されたHCVタンパク質は、レーン1の左の端に標識されており、分子量 (キロダルトン) は、レーン9の右側の端に記載されている。使用されるNS3/4特異的な抗血清 (3/4') は、有利にはNS4AおよびNS4Bと反応し、これはNS3の下位表示 (Unterrepräsentation) につながることをわかる。

【0100】すべてのウイルス抗原は明確に検出可能であり、かつその見かけの分子量は、2シストロンのHCV-RNA-構築物の一過性発現により本来のHu h-7細胞中で確認された分子量に対する差異を示さなかった。ウイルス抗原の細胞内分布を決定するために、NS3およびNS5A特異的な抗血清の使用下に免疫蛍光法-検出反応を実施した (例えばBartenschlager et al., 1995, J. Virol. 69, 7519による)。このためにクローン9-13 (wt) および8-1 (Δ) の細胞を、播種の24時間後にメタノール/アセトンを用いてカバーガラス上に固定し、かつポリクローナルNS3またはNS5A特異的な抗血清とともにインキュベーションした。

結合した抗体を市販のFITC-共役した抗ウサギ抗血清を用いて目視できるようにした。非特異的な蛍光シグナルの抑制のために、細胞を色素「エバンスブルー (Evans Blue)」で色分けした。

【0101】この検出の結果は図3Bに記載されている。両方の抗血清を用いて細胞質中の強い蛍光を検出することができた。NS5A特異的な抗血清はさらに弱い細胞核の蛍光につながり、このことは、この抗原の少なくとも少量が細胞核にも達したことを暗示している。しかし細胞質中のウイルス抗原の一般に優勢な存在は、HCV-RNA複製が、多くのRNAウイルスの場合に該当するように、細胞質中で行われていることに関する著しい指標である。

【0102】これらの結果は、ここに記載されている試験バッチを用いてHCVのための細胞培養系の構築が成功しており、その効率はすべて従来公知のサイズのオーダーに勝っており、かつ通例の、かつ実証済みの生化学的方法で初めてウイルス性の核酸およびタンパク質の検出を可能にしたことを明らかに裏付けている。この効率は初めてHCVの発病学の完全に詳細な調査、種々のHCV-機能の発生学的分析およびウイルス-宿主細胞の相互作用の精密な研究を可能にし、このことにより抗ウイルス治療法の開発のための手がかりを定義することができる。

【0103】例3：HCVゲノム構築物を用いたHu h-7細胞のトランスフェクション

例2に記載したようにHu h-7細胞をトランスフェクションし、かつ選択したが、しかしその際、ここで完全なウイルスゲノムを有している選択可能な構築物を使用した。得られた細胞クローンを例2と同様にしてHCV-DNAの不在下にPCRを用いて調査し、かつその後、HCV-RNAの産生複製を、ダクチノマイシンの存在下にノーザンブロット、[³H] ウリジン標識、ウイルスタンパク質もしくは抗原の検出を用いて、有利にはウエスタンブロット、免疫沈降法または免疫蛍光法を用いて検出した。例2に記載されているバッチとは対照的に、ここに記載されている構築物を用いて、さらに完全で、かつ極めて感染力の高いウイルスが得られるが、これは該部位 (例2中) に記載されているサブゲノム構築物の場合、該当しない。細胞および細胞培養上清中に存在しているこれらのウイルスは、例えば超遠心分離、免疫沈降またはポリエチレングリコールを用いた沈殿により濃縮し、かつすべての外因性、つまりウイルス粒子中に構築されていない核酸を、ヌクレアーゼ (RNase、DNase、単球菌ヌクレアーゼ) を用いたインキュベーションにより消化する。このようにして、保護ウイルス粒子中に含有されていないすべての汚染性の核酸を除去することができる。保護されたウイルスRNAをヌクレアーゼのインキュベーション後に、例えばプロテイナーゼKを用いたインキュベーションを用いてSDS

含有緩衝液中でフェノールおよびフェノール/クロロホルムを用いた抽出により単離し、かつHCV特異的なプライマーの使用下にノーザンブロットまたはRT-PCRを用いて検出する。この試験バッチでも前記のHCVコンセンサスゲノムと選択マーカーとの組み合わせはウイルスRNA、ウイルスタンパク質ひいてはHCV粒子の効果的な生産にとって決定的である。

【0104】例4：耐性遺伝子がリボザイムもしくはリボザイムのための認識部位を介してHCV-サブゲノム配列と結合しているHCV-RNA構築物の製造および適用

例1または例3によりHCV-RNA構築物を製造し、その際、抗生物質耐性遺伝子がリボザイムもしくはリボザイムのための認識部位を介してHCV-RNA配列と結合している。このような構築物は、図7に図示されている。Hu h-7細胞は、例えば例2に記載されているように、これらのHCV-RNA構築物でトランスフェクションされている。細胞へのトランスフェクション後に、まず、相応する抗生物質を用いた選択を行う。その際に得られる細胞クローン中で、単一クローン性リボザイムが活性化されるか、またはリボザイムのための認識部位を有する構築物の場合、リボザイムが細胞中に導入される（例えばリボザイム構築物のトランスフェクションまたはその中で相応するリボザイムが使用されたウイルス発現ベクターを用いた感染による）。両方の場合においてリボザイム媒介された分解により耐性遺伝子はHCV-RNA配列から分離される。その結果は、HCV-ゲノム構築物の場合、耐性遺伝子を有していない確立されたHCV-ゲノムであり、これは確立された感染性ウイルス粒子の形成のための能力がある。HCV-サブゲノム構築物の場合、耐性遺伝子を有していないHCV-レプリコンが生じる。

【0105】例5：別々のルシフェラーゼトランスフェクション構築物を用いたHCV-RNA構築物の同時トランスフェクション

例1（A）または例3または例4によりHCV-RNA構築物を製造する。これと並行して、ルシフェラーゼ遺伝子を含むトランスフェクション構築物を製造し、その際、HCV-プロテアーゼ（例えばNS3-プロテアーゼ）分割部位に関してコードする第一のヌクレオチド配列を用いて、このルシフェラーゼ遺伝子と、その他のタンパク質またはその他のタンパク質の一部をコードする第二のヌクレオチド配列とが結合している。HCV-RNA構築物およびトランスフェクション構築物を、任意の宿主細胞、有利には肝癌細胞、特にHu h-7細胞に導入する。これは例2に記載の方法で行うことができる。改変されたルシフェラーゼ遺伝子の生成物は、その中でルシフェラーゼが外来成分との融合に基づいて不活性化するルシフェラーゼ融合タンパク質である。高いHCV複製を有するトランスフェクションし

た細胞中で、HCV-プロテアーゼのための切断部位を有する融合タンパク質を分離し、ひいては発光測定(luminometrische Messung)により決定することができるルシフェラーゼの活性型を遊離する。HCV-RNA構築物の複製を抑制すると、融合タンパク質は分離せず、かつ活性ルシフェラーゼは遊離しない。従って、ルシフェラーゼの定量的な測定はHCV-サブゲノム構築物の複製のための尺度である。ルシフェラーゼ遺伝子の代わりに、同様に修飾されているその他のリポーター遺伝子も同様に使用することができるので、このリポーター遺伝子がHCV-サブゲノム構築物の成分ではなくても、その発現はウイルス複製に依存する。HCV-タンパク質または核酸により不活性化または活性化される細胞タンパク質もまたいわゆる代理マーカー(Surrogat marker)として使用することができる。この場合、この代理マーカーの発現もしくは活性化は、ウイルスDNAの複製のための尺度である。

【0106】例6：遺伝子治療のために肝癌細胞特異的な遺伝子輸送体として使用するための導入された外来遺伝子を有するHCV-サブゲノム構築物の製造

この組み換え型および選択可能なHCV-サブゲノム構築物を、トランス相補性ヘルパー細胞系、つまり誘発可能な、または構造的に欠けている機能を発現する細胞系（例えば構造タンパク質）にトランスフェクションする。機能的なHCV-サブゲノム構築物を有する細胞クローンを相応する選択により確立することができる。宿主細胞により発現したウイルス構造タンパク質は、その中へHCV-サブゲノム構築物のRNAを導入するウイルス粒子の形成を可能にする。その結果はつまり単一クローンした外来遺伝子も含めて本発明によるHCV-サブゲノム構築物を含有し、かつこれを感染によりその他の細胞に移すことができるウイルス様粒子である。このような構築物の例は図8に記載されている。ここに記載した、組み込まれた外来遺伝子を有する本発明によるHCV-サブゲノム構築物を直接発現ベクターとして使用する可能性もまた生じる。その場合、前記の方法と同様に行うが、しかしトランス相補性の因子を発現する細胞系をトランスフェクションすることが異なっている。この場合、HCV構築物は単に発現ベクターとして使用されるのみである。

【0107】例7：細胞培養に適合したHCV-RNA構築物の製造

(A) 単離法

適合した突然変異の測定および細胞培養に適合したHCV-RNA構築物の製造のために、以下の通りに行った：細胞をHCV-RNA構築物を用いて例1および2に記載されているようにトランスフェクションし、かつG418耐性細胞クローンを製造した。複製能力（これはこの関連において、トランスフェクションしたHCV-RNAもしくはHCV-RNA構築物1 μg

あたりに得られるG418-耐性細胞クローンの数と解
釈する)の測定のために模範的に9-13(図1B、レ
ーン11)と称する細胞クローンの1つからの全RNA
を単離し、かつその中に含有されているHCV-RNA
の量を図2Bに記載されているようにノーザンブロッ
クを用いて測定した。引き続き、HCV-RNAを約10⁹
分子含有している全RNAの10μgをエレクトロポ
レーションによりナイーブHu h-7細胞に導入した
(図9)。これと並行してナイーブHu h-7細胞から
単離した全RNAを用いて10μgの全RNA量に満た
した類似のneo-HCV-RNAのインビトロ転写10⁹
を、ナイーブHu h-7細胞にトランスフェクショ
ンした。G418を用いた選択後に、両方のバッチ中の
細胞コロニーの数を測定し、これをRNAμgあたりの
コロニー形成単位(colony forming units(cfu))で表し
た。選択媒体中、G418 500μg/mlの濃度の
場合、単離した全RNA中に含有されているHCV-R
NAにより得られたコロニーの数はHCV-RNAμg
あたり約10000cfuであった。これに対してイン
ビトロ転写された同量のHCV-RNAを用いてわず
か30~50コロニーが得られたのみであった。この結
果は、細胞コロニーから単離されたHCV-RNAの特
異的な感染力が、類似のインビトロ転写の感染力よりも
約1000~10000倍高いことを証明している。方
法論的プロセスは図9に記載されている。

【0108】「長距離RT-PCR(long-distance RT-
PCR)」を用いて、9-13細胞の全RNAからのHCV
-RNAを増幅し、PCR増幅物をクローニングし、
かつ数多くのクローンを配列決定した。この再クロー
ニングしたRNAの配列と、本来ナイーブHu h-7細胞
に導入されたRNAの配列との比較は、再クローニン
グしたRNAが全HCV配列にわたって分布している数
多くのアミノ酸交換を占有していることを明らかにした
(図10)。この再クローニングした突然変異体のSfi
I-断片を、本来のレプリコン構築物の類似のSfi
I-断片との交換でこの中に導入し、かつそれぞれの突
然変異体のRNAをナイーブHu h-7細胞に導入し
た。次いでG418を用いた選択後に、それぞれのHC
V-RNA-突然変異体に関して形成されたコロニーの
数を測定した。出発RNAではRNAμgあたりわずか
30~50のコロニーが得られたのみであったが、再ク
ローニングした変異体の2つの場合にはコロニー数が明
らかなり高かった(図10)。HCV-RNA-構築
物9-13Iおよび9-13Cの場合、特異的感染力は
RNAμgあたり100~1000cfuであり、かつ
9-13Fレプリコンの場合、それどころかRNAμg
あたり1000~10000であった。この結果は、突
然変異体9-13I、9-13Cおよび特に9-13F
が複製能力の明らかな上昇につながることを示してい
る。これに対してすべてのその他のHCV-RNA-構

築物(9-13A、B、G、HおよびK)は、もはや複
製能力がなく、従って致命的な突然変異を有していた。

【0109】9-13F-構築物中のアミノ酸交換のい
ずれが複製の増加につながるかという問いへの回答のた
めに、交換を単独で、または組み合わせて出発-HCV
-RNA-構築物に導入し、かつ相応するRNAをナイ
ーブHu h-7細胞に導入する。これらのRNAを用い
たトランスフェクションの結果は、第1表にまとめられ
ている。ここから本実施例では高い複製能力が複数の突
然変異により制限されていることが明らかである。HC
V-RNA-断片NS5AおよびNS4B中のアミノ酸
交換が大いに貢献している。NS3-領域における個々
の交換もまた、おそらくこの個別交換の相助作用に基づ
いて貢献している。この調査は、neo-HCV-RN
A-構築物でトランスフェクションされた細胞のG41
8-選択により、明らかに高い複製能力を有するH
CV-RNAを富化した。ここに記載された試験バッチ
を用いて極めて異なった複製効率を有するHCV-RN
A-構築物を選択することができる。その中/上でHC
V-RNA-構築物含有細胞が選択のために培養される
選択媒体中の抗生物質濃度が高いほど、細胞が成長する
ことができるためには適応突然変異の程度、ひいては該
当するHCV-RNA-構築物中での複製効率は高くな
くなくてはならない。低い抗生物質濃度での選択を実施す
ると、よりわずかな適合突然変異およびよりわずかな高い
複製効率を有する細胞もまた生き残り、かつ増殖するこ
とができる。

【0110】複数の適合突然変異を有する従来記載され
ていたHCV-RNA-構築物9-13Fは、疑う余地
なく親HCV-RNAより高い複製効率を有していた。
さらに高い複製を有するHCV-RNAを細胞培養中
で得るために、選択された細胞クローンの全RNA中に含
有されていたHCV-RNAを数回、ナイーブHu h-
7細胞中で継代した。この選択された細胞クローンは、
5-15と呼ばれ、HCV-RNA-構築物I₃₈₉/N
S3-3'を用いたトランスフェクションにより得られ
る(図1)。これは十分に、22のヌクレオチドの分だ
け短いHCV-IRESを有するHCV-RNA-構築
物を用いたトランスフェクションにより製造された細胞
クローン9-13に相当する(I₃₈₉/NS3-3'、
図1)。細胞クローン5-15から単離された全RNA
10μgを、エレクトロポレーションを用いてナイーブ
Hu h-7細胞に導入し、かつG418 1mg/ml
を用いて細胞を選択した。このようにして得られた細胞
クローンから、再度、全RNAを単離し、ナイーブHu
h-7細胞中にトランスフェクションし、かつ同様に
して選択した。この工程を合計して4回繰り返した。4
回目の継代の後で、細胞クローンから全RNAを単離
し、かつ「長距離RT-PCR」を用いてneo-HC
V-RNAを増幅した。増幅したDNA断片を制限酵

素 S f i I で消化し、かつ S f i I 制限された出発構築物 I₃₈₉ / NS 3-3' に挿入した。合計して 100 を越える DNA-クローンが得られ、かつまず制限消化を用いて分析した。インビトロで転写した約 80 のこれらのクローンの RNA をその都度ナイーブ H u h-7 に導入し、かつ G 4 18 500 mg/ml を用いて選択した。調査した 80 の neo-HCV-RNA-変異体から、大部分が複製欠陥であることが判明した。しかし 5. 1 および 19 と呼ばれる 2 つの突然変異体の場合、RNA マイクログラムあたりの「コロニー形成単位」と呼ばれる特異的な感染力は、極めて明らかに増大した (第 2 表)。細胞培養中での RNA の複数回の継代により、明らかに、その複製効率が、複数のサイズオーダーの突然変異 (いわゆる「適合突然変異」) に基づいて本来患者からクローンした RNA のものよりも高い HCV-RNA を製造することができる。

【0111】(B) 改変方法。

【0112】(A) により製造し、かつ同定された適合突然変異を、わずかに複製能力のある HCV-RNA-構築物中に移すことができ、かつこの構築物の複製の著しい向上につながる。この向上は極めて高いので、これにより明白に、選択可能なマーカー遺伝子をもはや有していない HCV-RNA を細胞培養中で複製することができる。図 12 は、HCV-RNA の複製効率の比較を示しており、これは出発配列または適応配列 9-13F もしくは 5. 1 に相応していた。容易な測定のために、neo-遺伝子を除き、かつルシフェラーゼのための遺伝子により交換した。ネガティブコントロールとして、再び、NS 5B RNA-ポリメラーゼの不活性化突然変異に基づいて複製欠陥のある HCV-RNA-構築物を使用した。トランスフェクションの 24 時間後にすでに、欠損 RNA と 9-13F もしくは 5. 1-構築物の間のルシフェラーゼ活性における明らかな違いが認識される一方で、欠損 RNA (318DN) と、適合突然変異を有していない出発-RNA-構築物 (wt) との間にはほとんど違いを見ることはできない。全観察時間の間、最も高いルシフェラーゼ活性ひいては最も高い 5. 1-RNA を有する複製が得られた。この調査は、この RNA の高い複製効率を証明するのみではなく、適応 HCV-RNA-構築物を用いて、そのために選択可能な遺伝子の存在がもはや必要ではない細胞培養系を構築することが可能であることもまた示している。出発構築物と、突然変異体 9-13F、5. 1 および 19 の間のヌクレオチドおよびアミノ酸の違いの包括的な概要は、第 3 表に示されている。

【0113】例 8：細胞培養に適合した HCV-RNA-全長ゲノムの製造

例 1~7 では常に、p 7 もしくは NS 2 までを含むコアの全構造タンパク質領域が欠けているサブゲノムの HCV-RNA を使用した。この例 8 では、適合した NS 3

-5B-配列を用いて細胞培養中の HCV-全長ゲノムを複製することが可能であることを示している。この目的のために、まず例 7 に従って製造され、高度に適合した HCV-RNA 5. 1 の S f i I-断片を、選択可能な HCV-全長ゲノムにトランスフェクションした (図 12)。この HCV-ゲノムをナイーブ H u h-7 細胞にトランスフェクションし、かつ異なった G 4 18-濃度で選択した。(G 4 18 濃度の) 選択強度に依存して、異なった大きさの細胞クローンの数が得られた (図 12B)。これと比較して、適合突然変異を受けなかった未変化の HCV-全長ゲノムではクローンは得られず、また NS 5B RNA-ポリメラーゼにおける不活性化突然変異に基づいて複製欠陥のあるネガティブコントロールでも同様であった。生じた細胞クローンが実際に自律的に複製する HCV-全長構築物を有していることに対する証明のために、全 RNA を複数の細胞クローンから単離し、かつノーザンブロットを用いて分析した。すべての細胞クローンにおいて HCV-全長 RNA は明確に検出可能であった (図 12)。これにより細胞培養に適合した HCV-配列を用いて、高い効率で、および自律的に細胞系で複製する HCV-全長ゲノムを製造することができる、つまり本発明による系を用いて適合した HCV-全長ゲノムを製造することが可能であることが明確に証明される。さらにこのクローンは、完全な HCV-配列、つまりウイルス粒子の形成のために必要な構造タンパク質もまた有しているので、この系を用いて大量の感染ウイルス粒子を細胞培養中で製造することが可能である。これらのウイルスの検出のために、細胞不含で、複製 HCV-全長ゲノムを有する細胞の上清をナイーブ H u h-7 細胞に添加し、かつこうして感染させた細胞を G 4 18 で選択する。前記の条件下で成長するそれぞれの細胞クローンは、感染した細胞に起因する。しかし複製する HCV-全長ゲノムを有する細胞の細胞培養上清中のウイルスは、従来技術で公知の種々の方法、例えば超遠心分離またはマイクロ透析 (Mikrodialyse) で富化し、かつ生成し、かつ次いでナイーブ細胞の感染のために使用することができる。この方法で、本発明による HCV-細胞培養系を用いて、細胞中で高い効率で複製し、かつ感染性のウイルスを産出する細胞培養に適合した HCV-全長ゲノムを製造することができることが明確に示されている。これらは同様に試験動物、有利にはチンパンジーの感染により検出することができる。

【0114】例 9：リポーター遺伝子を有する HCV-全長-構築物および HCV-サブゲノム-構築物の製造 HCV-RNA-構築物を製造したが、その際、抗生物質耐性遺伝子の代わりにリポーター遺伝子を挿入する (図 13)。その際、リポーター遺伝子もしくはリポーター遺伝子産物の量もしくは活性に基づいて複製を決定することができる。リポーター遺伝子は、有利にはルシ

フェラーゼ遺伝子の群、CAT-遺伝子（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ-遺伝子）、lacZ-遺伝子（ β -ガラクトシダーゼ遺伝子）、GFP-遺伝子（緑色蛍光タンパク質 (green fluorescence protein) 遺伝子）、GUS-遺伝子（グルクロニダーゼ遺伝子）またはSEAP-遺伝子（分泌された (sezer nierte) アルカリ性ホスファターゼ遺伝子）からの遺伝子である。これらのリポーター遺伝子もしくはこれらの産物、つまり相応するリポータータンパク質を、例えば 10 蛍光法、化学発光法、比色法により、または免疫学的方法（例えば固相酵素免疫測定法、ELISA）を用いて測定することができる。リポーター遺伝子は、固有のIRESにより発現させるか、またはそのままで活性であるか、もしくはタンパク質分解により分解可能なアミノ酸配列によりHCV-タンパク質と結合している融合タンパク質の形で発現させることができるので、これは細胞性またはウイルス性（HCV）プロテアーゼによりタンパク質から分離される。

【0115】例10：遺伝子治療のための肝細胞特異的な遺伝子輸送体としてまたは発現ベクターとしての使用 20 のための導入された外来遺伝子を有するHCV-全長-構築物の製造

構築物（図14）を細胞内に導入し、かつここでその他の細胞の感染のために使用することができるHCV-ウイルス粒子を形成させる。ウイルス粒子は外来遺伝子を有するRNAを包んでいてもよいので、この外来遺伝子によりコードされたタンパク質の産生のためにこのよう*

第1表：9-13F突然変異体において発見され、かつ親HCV-RNA-構築物 1389/NS3-3'/wtに導入された適応突然変異を用いたHCV-RNA-構築物の特異的な感染性 (cfu/ μ g RNA)

アミノ酸交換 ¹	HCV-タンパク質	cfu/ μ g RNA ²
なし		30 ~ 60
1283 arg -> gly	NS3	200 ~ 250
1383 glu -> ala	NS3	30 ~ 60
1577 lys -> arg	NS3	30 ~ 60
1609 lys -> glu	NS3	160 ~ 300
(1283 arg -> gly + 1383 glu -> ala + 1577 lys -> arg + 1609 lys -> glu)	NS3	360 ~ 420
1936 pro -> ser	NS4B	500 ~ 1000
2163 glu -> gly	NS5A	1000 ~ 5000
2330 lys -> glu	NS5A	30 ~ 60
2442 ile -> val	NS5B	30 ~ 60
合計		5000

¹ HCV-単離物 Con-1 (EMBL-Genbank No. AJ238799) のポリタンパク質中のアミノ酸交換
アミノ酸は3文字のコードで記載されている

² G418 500 μ g/ml の選択の際のコロニー形成単位（細胞コロニーの数）

* にして感染させた細胞中で外来遺伝子を使用することが
できる。構築物でトランスフェクションされた細胞は、
同様に外来遺伝子を発現する。

【0116】例11：耐性遺伝子産出がHCV-割合を
有する融合タンパク質として発現する単シストロンのH
CV-RNA-構築物の製造

特定の調査にとって、HCV-RNA-構築物が異種 I
RES-エレメントを有していない場合には有利であ
る。このような調査は例えばインターフェロン耐性の決
定である。HCV-RNA-構築物を有する細胞をイン
ターフェロン- α またはインターフェロン- β を用いて
インキュベーションすると、これはHCV-RNAの複
製の減少につながる。作用機構の解明のために、HCV
-RNA-構築物が異種 IRESを有していないことが
必要である。というのもさもないとインターフェロン媒
介された抑制がHCV-複製の抑制により媒介されるの
か、または異種 IRESの抑制により媒介されるのか決
定することができないからである。従って、耐性遺伝子
がHCV-タンパク質と融合する構築物を製造する。

（図15）。融合タンパク質がそのままで活性である
か、または細胞性またはウイルス性（HCV-）プロテ
アーゼによりここから分離するように耐性遺伝子産物が
タンパク質分解により分解可能なアミノ酸配列によりH
CV-タンパク質と結合している。

【0117】

【表1】

【0118】

* * 【表2】

第2表：親HCV-RNA-構築物1389/NS3-3'/wtおよび
変異体9-13C、9-13I、9-13F、5.1および19の
特異的感染性 (cfu/μg RNA)

トランスフェクションしたRNA-変異体	cfu/μg RNA ¹
野生型	30 ~ 50
9-13 C	100 ~ 1,000
9-13 I	100 ~ 1,000
9-13 F	1,000 ~ 10,000
5.1	50,000 ~ 100,000
19	50,000 ~ 100,000

¹ G418 500μg/mlの選択の際のコロニー形成単位（細胞コロニーの数）

【0119】

【表3】

第3表：親HCV-RNA-構築物1389/NS3-3'/wtおよび
突然変異体9-13I、9-13F、5.1および19の間の
ヌクレオチドおよびアミノ酸の相違

HCV 突然変異体	ヌクレオチド位置	ヌクレオチド交換	アミノ酸交換
9-13 I	3685	C > T	Pro > Leu
	4933	C > T	Thr > Met
	5249	T > C	-
	8486	C > T	-
	8821	G > A	Trp > stop
	8991	C > G	Arg > Gly
	9203	A > G	-
	9313	T > C	Phe > Ser
	9346	T > C	Val > Ala
9-13 F	3866	C > T	-
	4188	A > G	Arg > Gly
	4489	A > C	Glu > Ala
	4562	G > A	-
	4983	T > C	-
	5071	A > G	Lys > Arg
	5166	A > G	Lys > Glu
	6147	C > T	Pro > Ser
	6829	A > G	Glu > Gly
	7329	A > G	Lys > Glu
	7664	A > G	Ile > Val
	8486	C > T	-
	8991	C > G	Arg > Gly
NK5.1	4180	C > T	Thr > Ile
	4679	C > T	-

	4682	T > C	-
	5610	C > A	Leu > Ile
	6437	A > G	-
	6666	A > G	Asn > Asp
	6842	C > T	-
	6926	C > T	-
	6930	T > C	Ser > Pro
	7320	C > T	Pro > Ser
	7389	A > G	Lys > Glu
NK19	3946	A > G	Glu > Gly
	4078	C > G	Ala > Gly
	4180	C > T	Thr > Ile
	4682	T > C	-
	5610	C > A	Leu > Ile
	5958	A > T	Met > Leu
	6170	T > A	-
	6596	G > A	-
	6598	C > G	Ala > Gly
	6833	C > T	-
	6842	C > T	-
	6930	T > C	Ser > Pro
	7141	A > G	Glu > Gly
	7320	C > T	Pro > Ser
	7389	A > G	Lys > Glu
	7735	G > A	Ser > Asn

【0121】記載は、出発-HCV-RNA-配列Con1 (EMBL-遺伝子バンク (Genbank) No. AJ238799) および細胞培養に適合したHCV-RNAの配列との間のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列の

違いである。数はHCV-単離物Con1のヌクレオチド位置およびアミノ酸位置に関する。

【0122】

【外3】

<110> Bartenschlager, Ralf
 <120> Hepatitis C Virus cell culture system
 <130> ba-1
 <140> 199 15 178.4
 <141> 1999-04-03
 <160> 11
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 11076
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus
 <400> 1
 gccagccccc gattgggggc gacactccac catagatcac tcccctgtga ggaactactg 60
 tctttcacgca gaaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgcgtgcag cctccaggac 120
 cccccctccc gggagagcca tagtgggtct cggaaacggc gagtacaccg gaattgccag 180
 gacgacgggg tncctttcttg gatcaaccgg ctcaatgccc ggagatttgg gcgtgcccc 240
 gcgagactgc tagccagata gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgttggtact gcctgatagg 300
 gtgcttgcga gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgugcacy aatccclaaac 360
 ctcaagaaaa aaccaaactt aacaccaaag ggcgcgcgat gatgaacaa gatggattgc 420
 acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga ggctattlcc clalgaclly gcacaacaga 480
 caatcggctg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcage gcaggggggc ccggttcttt 540
 ttgtcaagac cgaactgtcc ggtgccccta atgaactgca ggaagaggca gcgcggctat 600
 cgtggctggc cagcaggggc gttccttgcg cagctgtgct cgaactgttc actgaagcgg 660
 gaaggagactg gctgctattg gcggaagtgc cggggcaggga tctcctgtca tctcacttg 720
 ctccctgcga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgag ggggtgcgat acgcttgatc 780
 cggctacctg cccattcgac caccgaagca aacatcgcat cgagcgagca cgtactcggg 840
 tgggaagccgg tcttgctgac caggatgata tggacgaaga gcacagggg ctccgcgcag 900
 ccgaactgtt cgcacggctc aayggcgcga tgcgcgacgg cgaggatctc gtcgtgaccc 960
 atggtcgatgc ctgcttgcgg aatatcatgg tggaaaaatg ccgcttttct ggattcatcg 1020
 actgtggcgg gctgggllg ggggacccgt atcaggacat agcgttggct acccgtgata 1080
 ttgctgaaga gcttggcggc gaatgggctg accgcttctc cgtgctttac ggtatogccg 1140
 ctcccgattc gcagcgcatc gacttctatc gacttcttga cgaattcttc tgagttttaa 1200
 cagaccacaa cggtttccct ctagcgggat caattccgac cctctccctc cccccccct 1260
 aacgttactg gccgaagccg cttggaataa ggcgggtgtg cgtttgtcta tatgttattt 1320
 tccaccatct tgcctgtctt tggcaatgtg agggcccgga aacctggccc tgtcttcttg 1380
 acgagcatct ctgaggglll tccctctctc gccaaaggaa tgcaggtctc gttgaatgtc 1440
 gtgaagggaag cagttctctt ggaagcttct tgaagacaaa caacgtctgt agcgaacctt 1500
 tgcagggcagc ggaaccccc ccttgccgac aggtgcctct gcggccnaaa gccacgtgta 1560
 taagataaac ctgcaaaagg ggaacaaacc cagtgcaagc ttgaggttg gatagtttg 1620
 gaaagaghta aatggctctc ctcaagccta tcaacaagg ggtgaagga tgcacagaag 1680
 gtaccccatc gtaaggatc tgaatgggg cctcgggtga catgctttaa abgtgtttag 1740
 tcgaggttaa aaaaagctca ggcceccgga accacgggga cgtggttttc ctttgaanaa 1800
 caccataata ccatgggac gaactctaaa cctcaagaa aacccaaac taacaccaac 1860
 cgcgcgccac aggaagtcac gttcccgggc ggtggctcag lcgtaggttg aqlltacctg 1920
 ttgcgcgca ggggccccag gttgggtgtg cgcgcgacta ggaagacttc cgagcggtcg 1980
 caacctcgtg gaaggcgaca acctatcccc aaggtctgac agcccgaggg tagggcctgg 2040
 gctcagcccg ggtaccccc qccctctctt ggcaatgagg gcttggggtc ggcaggatgg 2100
 ctactgtcac cccgtggctc tgggctagt tggggcccca cggacccccc gcgtaggctg 2160
 cgaatttgg gtaaggctcat cgataccctc acgtcgggtc tgcggatctc catgggttac 2220
 attcgcctc tggcgccccc ctatgggggg gctggcagg ccctgagcca tggcgctcgg 2280
 gtttctggagg acggcgtgaa ctatgcaaca gggaaatctg ccggttgcct ctttctctac 2340
 ttcttttttg ctttgcgtgc ctgtttgacc atccagctt ccgcttatga agtgcgcaac 2400
 gtatccggag tgaacctgt caccgaagac tgcctcaaac caagcatgt gtaagagga 2460
 gcggacatga tcatgcatac ccccggtgc gtgcctgcg ttccggagaa caactctctc 2520
 cgtgtctggg tagcgctcac tcccaagctc ggggcaggga acgttagctt cccactaacg 2580
 acgatacagc gccatgtcga ttgtctgtt ggggcgggtg ctctctgtc cgtatgtac 2640
 gtggggatgc tctggggatc gttttctc gtcgcccagc tgttcaactt ctgcctctgc 2700

【0123】

【外4】

55
 cggcagcaga cagtacagga ctgcaattgc tcaatatatc cgggccacgt gacaggtcac 2760
 cgtatggcctt gggatatgat gatgaactgg tcacctacag cagccctagt ggtatcgag 2820
 ttactccgga tcccacaagc tgctgtggat atgggtggcg gggccatttg gggagtccca 2880
 gccggcccttg cctactatct catggtgggg aactgggcta aggttctgat tgtgatgcta 2940
 ctctttggcg gcgttgacgg gggaacctat gtgacagggg ggacgatggc caaaaacacc 3000
 ctccgggatta cgtccctctt ttcaaccggg tcatcccgaga aaatccagct tgtaaacacc 3060
 aacggcagct ggcacatcaa uaggautgcc ctgaactgca atgaactccct caacactggg 3120
 ttcccttgctg cgctgttcta cgtgcacaag ttcaactcat ctggatgccc agagcgcatg 3180
 gccagctgca gccccatcga cgcgttcgct cagggttggg ggcccatcac ttacaatgag 3240
 tcacacagct cggaccagag gcoctattgt tggcaactacg caccccggcc gtgcggtatc 3300
 gtacccggcg cgcaggtgtg ttgtccagtg tactgcttca ccccaagccc tgtcgtgggt 3360
 gggacgacgg accggttcgg cgtccctacg tacagtgggg gggagaatga gacggacgtg 3420
 ctgcttctta acaacacggc gccgcccga ggcaactggg ttggctgtac atggatgaat 3480
 agcactgggt tcaaccaaga gtgcgggggg cccccgtgta acatoggggg gatcggaat 3540
 aaaaacttga cctgccccac ggactgcttc cggaaagcacc ccgaggccac ttacaccaag 3600
 tgtgtgtcgg ggccttgggt gacacccaga tgcctgggtc actaaccata caggcttttg 3660
 cactacccct gcaactgtcaa ctttaccatc ttcaagggtta ggtgtacgt ggggggagtg 3720
 gagcacaggg tcgaagcccg actcgaggag agcgttgtaa cctggaggag 3780
 agggacagat cagagcttag cccgtgctg ctgtctacaa cggaglggca ggtatgtccc 3840
 tgttccctta ccaacctacc ggctctgtcc actggttga tccatctcca tcagaacgtc 3900
 gtggacgtta aatcacgtga cgttatggg ttggcggttg totcctttgc aatcaaatgg 3960
 gagtatgtcc tgtgtctctt ccttctcttg gcggacggcg gcgtctgtgc ctgcttgtgg 4020
 atgatgtctc tgatagctca agctgaggcc gccctagaga acctggtggt cctcaacggc 4080
 gcacccgtgg cggggcgcca tggcaatttc tccctcctcg tgttctcttg tgcgtcgtg 4140
 tacatcaagg cagggtgggt cctcggggcg gcataatgcc tctacggcgt atggccgcta 4200
 ctccgtctcc tgcgtggcgt accaccacga gcatacgcca tggaccggga gatggcagca 4260
 tccgtcgagg cgcgggtttt cgtaggtctg alactcttga ccttgtcacc gcactataag 4320
 ctgttccctc ctaggctcat atggtgggta caatatctta tcaaccgggc cggaggcacac 4380
 ttgcaagtggt ggatcccccc cctcaacggt cggggggggc gcgatgcgt catcctcctc 4440
 acgtgcgcga tccaccacga gctaactctt accataacca aaatcttgct cggcatactc 4500
 ggtccactca tgggtgctcca ggctgggata accaaagtgc cgtacttcgt gcgcgcacac 4560
 gggctccattc gtgcattgat gctggtgcgg aaggttgctg ggggtcatta tgtccaaatg 4620
 gctctcatga agttggccgc actgacaggt acgtacgttt atgaccatcc caccocactg 4680
 cgggaactgg gccacgcggg cctacgagac cttgcgggtg cagttgagcc cgtcgtcttc 4740
 totgatatgg agaccaaggt tatcactctg ggggcagaca ccggcgctg tggggacatc 4800
 atcttggggc tgcctgtctc cgcgcgaggg gggagggaga tacatctggg accggcagac 4860
 agccttgagg ggcaggggtg ggcactcttc gcgcctatta cggcctactc ccaacagagc 4920
 cggagccctac ttggctgcat catcactagc ctacacagggc gggacagga ccaaggtcgag 4980
 ggggaggtcc aagtgtctc caccgcaaca caatcttctc tggcgacctg cgtcaatggc 5040
 gtgtgttggg ctgtctatca tgggtccggc tcaaaagacc ttgcccggcc aaagggccca 5100
 atccccaaa tgtacaccaa tgtggaccag gacctcgtcg gctggcaagc gccccccggg 5160
 gcgugllcct tgacaacatg caactgcggc agctcggacc tttaacttgt caccagggcat 5220
 gccgatgtca ttccggtgcg cggcgggggc gacagcaggg ggaagcctact ctccccagg 5280
 cccgtctcct acttgaagg ctccttgggc ggtccactgc tatgcccctc ggggcacgtc 5340
 gtgggcatct ttccggctgc cgtgtgcacc cgaaggcggt ggaactttgt 5400
 cccgtcgagt ctatggaaa cactatgcgg tccocggtct tcaaggacaa ctccgtccct 5460
 cccggccgac cgcagacatt ccaggtggcc catctacacg cccctactgg tagcggcaag 5520
 agcactaagg tgcgggtgc gtatgcagcc caagggtata aggtgttltl cctgaacccg 5580
 tccgtgcggc caacctaggt ttccggggcg tatatgtcta aggcacatgg tatcgacct 5640
 aacatcagaa cccgggtaag gacctcacc acgggtgccc ccatcacgta ctccacctat 5700
 ggcaagtltc ttgcgcagcg tgggtgtctc gggggcgcc atgacatcat aatatgtgat 5760
 gagtgcact caactgactc gacctatctc ctgggcatcg gcaagtgctt ggaaccaagc 5820
 gagacggctg gagcgagact cgtcgtgctc gccaccgcla cgcctcgggg atcgggtcac 5880
 gtgccacatc caaacatcga ggaggtggct ctgtccagca ctggagaaat ccccttttat 5940
 ggcaaaagca tcccacatga gacctcaag ggggggaggg acctcatttt ctgccattcc 6000
 aagaagaaat gtgatgagct ccgcgcgaag ctgtccggcc tccgactcaa tgcgttagca 6060
 tattaccggg gccttgatgt atccgtcata ccaactagcg gagacgtcat tgcgttagca 6120
 acggacgctc laalgacggg ctttaacggc gatttgaact cagtatcga ctgcaatata 6180
 tgtgtcacc agacagtcga cttcagcctg gacctgacct tcaccattga gacgacgacc 6240
 gtgcacaaag acgcygtgtc acgctcgcag cggcgaggca ggaactggtag gggcaggtatg 6300
 ggcatattaca ggtttgtgac tccaggagaa cggccctcgg gcatgttcga ttccctcggt 6360
 ctgtgcgagt gctatgacgc gggctgtgct tggtaacagc tcacgcccgc cgaagaccca 6420
 gttagggtgc gggcttacct aaacacacca gggttgccg tctgccagga ccatctggag 6480
 ttctgggaga gcgtctttac aggcctcacc cacatagacg cccattctct gtcccaagct 6540
 aagcagycag gagacaaact cccctacact gtagcatacc aqgtacaggt gtcgcacagg 6600
 gctcaggtcc caccctcacc gtcggaccaa atgtggaagt gtctcatacg gctaaagcct 6660

57

acgctgcacg ggccaaacgc cctgclglal agcctgggag ccgttcaaaa cgaggttact
accaacaccc ccaataacca atacatcatg gcacgtcatg cggctgacct ggaggtctgc
acggagcacl yyytgcctgt agcggagto czagoageto tggncggtta ttgctgaca
acaggcagcg tggctattgt gggcaggato atcttgtccg gaaagccggc calcalluu
gacagggaag tcccttaccg ggagttcgat gacatggaaq agtgcgcctc acacccctc
tacatcgaaac agggaaalgca gclcgccgaa caallcaaac agaaggcaat cgggttgcgt
caaacagcca ccaagcaagc ggaggtctgt gctcccgctg tggaaatccaa gtggcggacc
clgaagacct tctggggcaa gcatactgtgg aatttcatca gcgggataca atatttagca
ggcttgtcca ctctgcctgg caaccccgag atagcatcac tgatggcatt cacagccctc
atcaaccagcc cgcctaccac ccaacatacc ctctgttcta acatcctggg gggatgggtg
gccccecaac ttgtctctcc cagcgctgcl lclgcltleg taggcgcgg catcgctgga
cggtgtgttg gcagcatagg ccttgggaag gtgctgttg atattttggc aggttatgga
gcagggtgtg caggcgcgct cgtggccllt aaggtca lga gggcgagat gcoctccacc
gaggacctgg ttaacctact cctgtctatc ctctccctg gcgcctagt cgtcggggte
gtgtgcgcag cgatactgcg toggcaagtg gcccagggg aggggctgt gcatggatg
aacgggtgta tagcgttgcg ttocgggggt aaccacgtct ccccccagca ctatgtgct
gagagcgaag ctgcagcaag tgcactcag atctctcta gtcttaccat cactcagctg
clgaagaggc ltcacagtg galcaacgag gactgctcca cgcctatgct cggctcgtg
ctaagagatg tttgggattg gatagcacg gtgttgactg attcaagac ctggtccag
tccaggtccc tgcggcgatl gccgggagtc ccttctctct catgtcaacg tgggtacaag
ggagtctggc gggcgagcg calcatgcaa accacgtgcc catgtggagc acagatcacc
ggacatgtga aaaacggttc catgaggatc gtggggccta ggacctgtag taacacgtg
catggaaatc tcccattaa cgggtacacc aogggccctc gcacgccc cccggcgcca
aattattcta gggcgctgtg gcgggtgtgt gctgaggagt acgtggaggt tacggcggtg
gggtgatttc actacgtgac gggcatgacc actgacacg taaagtgcgc gtgtaaggtt
ccggcccccg aattcttacc agaalgat ygglycgg lgcacaggta cgcctcagcg
tgcaaacccc tccatcgga ggaggtcaca ttctgtgtg ggtcactca atacctggt
gggtccacag tccatgcga gccgaacgc gacgtagcag tgcctacttc catgctcacc
gacccctccc acattacggc ggagacggct aagcglaggg lggccagggg atctccccc
tccctggcca gctcatcagc tagcagcgtg tctgcgcctt ccttgaaggc aacatgcact
acccgtcatg acclcccgag cgtgacccct atogaggcca acctcctgtg gcggcaggg
atgggcggga acatcaccgc cgtggagtca gaaaataagg tagtaatttt ggactcttcc
gagccgcclcc aagcggagga ggtgagagg gaagtatccg ttccggcgga gatcctgcyg
aggtccagga aattccctcg agcgtgccc atatgggca cccgggatta caaaccctca
clglagagtl cctggaagga cccggactac gtccctccag tggatcacgg gtgtccattg
ccgctgcca aggcctctcc gataccacct ccacggagga agaggacgtt tgtcctgtca
gaatctaccc tgtctcttgc cttggcgagg ctogcccaa agaccttggc cagctccgaa
tcgtcgccgc tgcacagcg cccggcaacg gctctctctg accagccctc cgcagcggc
gacggggatc ccagcgttga gtctactcc tccatgcacc cclttaggg ggagcgggg
gacccgatc taagcgacgg gtcttggct accgtaagcg agggagctag tgagggagtc
glclgctgcl ccatgtccta ccatggaca ggcgcctga tccggcatg cgttgcggag
gaaccacagc tgcctatcaa tgcactgagc aactcttgc tccgtacca caacttggc
tatgtacaaa catctcgag ccgaagcctg cggcagagga aggttacctt tgacagatg
caggtctctg accgaccata cgggacgtg ctcaaggaga tgaggcgaa ggcgtccaca
gtbaaggtca aacttctatc cgtggaggaa gctgttaagc tgacgcccc acattcggc
agatctaaat ttggctatgg gcaaaaggac gcccggaaac tatccagcaa ggcgttacc
cacatcgct cgtgtggaa ggacttgcg gaagacactg agacaccaat tcacaccacc
atcatggcaa aaaaaggg lltctgctg caaccagaga agggggggc caagccagct
cgctctacc tatccacaga tttgggggtt cgtgtgtgag agaaaatggc cctttacgat
gtggclccca cctccctca ggccgtgat ggctctctat acggattcca atactctct
ggacagcggt tccagttcct ggtgaatgce lggaaagcga agaaatgccc tatgggctc
gcatacgaca cccgtgttt tgactcaacg gtcactgaga atgacatccg tgttggagg
tcaatctacc aatgttglga cltggccccc gaagccagac aggcataag gtogctcaca
gagcggtctt acatcgggg cccctgaact aattctaaa ggcagaaact cggctatgc
cgggtcccg cagcggtgt actgacgacc agclgggla alaccctcac atgttactt
aaggccgctg cggcclgtg agctgcgaag cccagagact gcacgatgt cgtatgcga
gacgacttg togttatctg tgaagcgcg ggaaccaa aggaagagg gagcctaag
gccttccag aggtatgac tagatactet gccccctg gggacccgc caaaccagaa
tagacttgg agthataac atcatgtcc tccaatgtt cagtcgcga ccatgcatct
ggcaaaaagg lglactlclt ccaaccaccc ccltgcgg gctgtggtg
gagacagcta gacacactcc agtcaattcc tggctaggca acatcatcat gtatgcgcc
accltlygg caaggaagat cctgatgact catctctct ccatcctct agctcaggaa
caacttgaaz aagccctaga ttgtcagatc tacggggcct gtbactcca tgagccactt
gacclaccl agalcatlca adgactccat ggcttagcg caltttcaat ccatagttac
tcccaggtg agatcaatag gglggcllca lgcclcagga aactlgggyl accgccttg
cgaclctga ccatcgggc cagaagtgtc cgcgttagc tactgtccca gggggggagg

58

6720
6780
6840
6900
6960
7020
7080
7140
7200
7260
7320
7380
7440
7500
7560
7620
7680
7740
7800
7860
7920
7980
8040
8100
8160
8220
8280
8340
8400
8460
8520
8580
8640
8700
8760
8820
8880
8940
9000
9060
9120
9180
9240
9300
9360
9420
9480
9540
9600
9660
9720
9780
9840
9900
9960
10020
10080
10140
10200
10260
10320
10380
10440
10500
10560
10620

【0125】

gctgcactt gtggcaagta cctcttcaac tgggcagtaa ggaccaagct caaactcact 10680
ccaatccgg ctgcgtccca gttggattta tccagctggg tegtgtgtgg ttacagcggg 10740
ggagacatat atcacagcct gtctcgtgcc cgaacccgct ggttcatgty glgectacte 10800
ctactttctg taggggtagg catctatcta ctcccaacc gatgaacggg gagctaaaca 10860
ctccaggcca ataggccatc ctgttttttt ccttttttt tttcttttt ttttttttt 10920
tttttttttt ttttttttt tctcttttt ttctcttttt tttcttttt ttctcttttt 10980
tggctccatc ttagccctag tcaaggctag ctgtgaaagg tccgtgagcc gcttgactgc 11040
agagagtgt gatactggcc tctctgcaga tcaagt 11076

【0126】

【外7】

<210> 2
 <211> 8637
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

<400> 2
 gccagccccc gallgggggc gacactccac catagatcac tccccctgtga ggaactactg 60
 tctttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgtcgtgcag cctccaggac 120
 cccccctccc gggagagcca tagtgggtctg cggaaaccggt gagtacaccg gaattgcacg 180
 gacgaccggg tcttttcttg gatcaacccg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
 gcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtgggtact gcctgatagg 300
 gtgcttgcga gtccccggg aggttctgtg gaccgtgcac catgagcagc aatcctaaac 360
 ctcaaaagaa aaccaaaggg cgcgccatga ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc 420
 cggccgcttg gglggagagg ctattcggct atgactgggc acaacagaca atcggctgct 480
 ctgatgcggc cgtgttcagg ctgtcagcgc agggggcgccc ggttcttttt gtcaagaccg 540
 acctgtccgg tgcctgaat gaactgcagg acgaggcagc gcggctatcg tggctggcca 600
 ogacggggcgt tcttgcgca gctgtgctcg acgttgcac tgaagcggga agggactggc 660
 lyctattggg cgaagtgcgg gggcaggatc tctgtctatc tcaacttgcct cctgcggaga 720
 aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc 780
 cattcgacca ccaagcgaat catcgctcag agcgagcagc tactcggatg gaagccgggt 840
 tlgtcgatca ggaatgatct gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc gaactgttgc 900
 ccaggctcaa ggccgcgatg ccgacggcg aggatctcgt cgtgacccat ggcgatgcct 960
 gcttcggcaa tatcatggtg gaaatggcc gcttttcttg attcatcgac tgtggcggcg 1020
 tgggtgtggc ggaacgclat caggacatag cgttgcgtac cctgtatatt gctgaagagc 1080
 ttggcgcgca atgggtgac cgttctctcg lyctttacgg tatcgccgct cccgatccgc 1140
 agcgcctcgc ctctatcgc cttcttgac agttcttctg agtttaaca gaccacaacg 1200
 gtttccctct agcgggatca attccgcccc tctccctccc cccccctaa cgttactggc 1260
 cgaagccgct cgggaataagg ccggtgtgag ttgtctata tgttattttc caccatattg 1320
 ccgtcttttg gcaatgtgag ggcccggaat cctggccctg tcttcttgac gacattctc 1380
 aggggtctct cccctctcgc caaaggnaat caaggtctgt tgaatgtcgt gaaggaagca 1440
 gttctctcgg aagcttcttg aagacaaaac acgtctgtag cgaccccttg caggcagcgg 1500
 aacccccac ctggcgacag glgctctgct ggccaaaagc cactgtgata agatacacc 1560
 gcaaaagcggt cacaacccca gtgccacgtt gtgagttgga taqttgtgga aagagtcaaa 1620
 tggctctcct caagcgtatt caacaagggg ctgaaggatg ccagaaaggt accccattgt 1680
 atgggatctg atctggggcc togtgtgaca tgcctttacat gtgtttagtc gaggttaaaa 1740
 aacylctagg cccccgaac caccgggagc tggttttcct ttgaaaaaca cgtaatatcc 1800
 atggaccggg agatggcagc atcgtgcgga ggcggggttt togtaggtct gatactcttg 1860
 acctgtgcac cgcactataa gctgttctct gctaggctca tatggtgglt acaatatttt 1920
 atcaaccagg ccgaggacaa cttgcaagtg tggatccccc cectcaacgt tccggggggc 1980
 cgcgatgcgg tcatctctct cactgtgcgg atccaccag agctaatctt taccatcac 2040
 aaaaactctg cgcgcatact cgttccactc atgggtgctc aggtcgttat aaccaaagt 2100
 ccgtactctg tgcgcgcaca cgggtctcat cglgcatgca tgcctgtgcg gaaggttgc 2160
 ggggggtcatt atgtccaaat ggtctctcat aagtggccg cactgacagg taactacgtt 2220
 tatgaccatc tcaacccact ggcgggactg gcccaacggg gcctacgaga ccttgcggtg 2280
 gcagttagc ccgtctctct ctctgatag gagacaaagg ttatcacctg gggggcagac 2340
 accgcgcggt gtggggacal catcttgggc ctgcccgtct ccgcccagc ggggaggag 2400
 atacatctgg gaccggcaga cagcctgaa gggcaggggg ggcgaactct cgcgcctatt 2460
 acggcctact cccaacagac gcgaggccta cttggctgca tcatcaotag cctcacaggc 2520
 cgggacagga accaggtcga gggggaggta caagtgtctt ccacgcacac acaatctttc 2580
 ctggcgacct gcgtcaatgg cgtgtgttgg actgtctate atggtgcggg ctcaagacc 2640
 cttgcccggc caaaggggcc aalcaaccaa atgtacacca atgtggacca ggcactcgte 2700
 ggctggcagg cgcgcccggt ggcgcgttcc ttgaacacat gcaactgcgg cagctcggac 2760
 ctttactctg tcaogaggca lgcgatgtc attccgggtg gccggcgggg cgacagcagg 2820
 gggagcctac tctcccccag gccctgtctc tacttgaagg gctcttcggg cgtcttcagg 2880
 ctctgcctct cggggcagc tgtgggcata tttcgggctg ccgtgtgcac ccgaggggtt 2940
 gegaaggcgg tggactttgt aaccgthogag tctatggaaa ccaactatgc gtcgcccggt 3000
 ttcaoggaca actcgtcccc tccggcgtga ccgcagacat tccaggtggc ccatctacac 3060
 gccctactg gtacgggcaa gacaulaag gtgcgggtgt cgtatgcagg ccaagggtat 3120
 aaggtgcttg tctgaaccc gtccgtgcgc gccacccatg gtttcggggc ghatatgtct 3180
 aaggacatg gtatgcaccc laacatcaga accggggtaa ggaccatcac caccgggtgcc 3240
 cccatcacgt actccacct tggcaagttt cttgcgcagc gtggttgcct tggggggcgc 3300
 tatgacatca taatatgtga tgagtgcac tcaactgact cgaccaetat cctgggcact 3360
 ggcaacgtcc tggaccaagc ggagcggul ggcgcggcag togtcgtgct cgcacccgtc 3420
 acqclccgg gatcggtcac cgtgccacat ccaaacatcg aggggtggc tctgtccagc 3480
 actggagaaa tcccccttta tggcaaggcc atccccatcg agaccatcaa gggggggagg 3540

61	cacctcattt	tctgccattc	caagaagaaa	tgtgatgagc	tcgccgcgaa	gctgtccggc	3600
	ctcggactca	atgctgtagc	atattaccgg	ggccttgatg	tatccgtcat	accaactagc	3660
	ggagacgtca	ttgtcgttagc	aacggacgct	ctaatagcgg	gctttaccgg	cgaattcgac	3720
	tcagtgtatcg	actgcaatac	atgtgtcacc	cagacagtcg	acttcagcct	ggacccgacc	3780
	ttcaccattg	agacgacgac	cgtgccacaa	gacgcggtgt	cacgctcgca	gcggcgaggc	3840
	aggactggta	ggggcaggat	gggcatttac	aggtttgtga	ctccaggaga	acggccctcg	3900
	ggcatgttcc	attcctcggt	tctgtgcgag	tgtatgacg	cgggctgtgc	ttggtacgag	3960
	gtcacgccc	ccgagacctc	agttagggtg	cgggcttacc	taaacacacc	agggttgccc	4020
	gtctgcagg	accatctgga	gttctgggag	agcgtcttta	caggccctcac	ccacatagac	4080
	gccatttct	tgtcccagac	taagcaggca	ggagacaaact	ccccctacct	ggtagcatac	4140
	caggctacgg	tgtgcgccc	ggctcaggct	ccacctccat	cgtgggacca	aatgtggaag	4200
	tgtctcatac	ggctaaaagg	tacgctgcac	gggccaaacgc	ccctgctgta	taggctggga	4260
	gccgttcaaa	acgaggttac	taccacacac	cccataacca	aatacatcat	ggcatgcatg	4320
	tcggctgacc	tggaggctgt	cacgagcacc	tgggtgctgg	tagggcggagt	cctagcagct	4380
	ctggcccggt	attgctgac	aacaggcagc	gtggtcattg	tgggcaggat	catcttctcc	4440
	ggaaagccgg	ccatcatctc	cgacagggaa	gtcctttacc	gggagtkaga	tgaagtggaa	4500
	gagtgccgct	cacacctccc	ttacatcgaa	cagggaatgc	agctcgccga	acaattcaaa	4560
	cagaaggcaa	tcgggttct	gcaaacagcc	accaagcaag	cggaggctgc	tgctcccggt	4620
	gtggaatoca	agtgggggac	cctogaagcc	ttctggggca	agcatatgtg	gaatttcac	4680
	agcgggatac	aatttttagc	aggcttgtcc	actctgcttg	gcaacccccc	gatagcatca	4740
	ctgattggcat	tcacagcctc	tatcacagc	cgcctcacca	cccaacatac	cctcctgttt	4800
	aaatctctgg	ggggtatgggt	ggcgcgcgaa	cttctctctc	ccagcgtctc	ttctgcttct	4860
	gtagggcccg	gcacgcgtgg	agcggctgtt	ggcagcatag	gcttgggaa	ggtgctgtgt	4920
	gatatttttg	caggttatgg	agcaggggtg	gcaggcgcgc	tcgtggcctt	taaggctcatg	4980
	agcggcgaga	tgcctccacc	cgaggacctg	gttaacctac	ccccctctat	cctctccccc	5040
	ggcgccctag	tcgtcggggt	cgtgtgcgca	gcgatactgc	gtcggaacgt	gggcccagg	5100
	gagggggcgt	tgcatgtgat	gaacccgctg	atagcgttct	cttcgcgggg	taaccaagtc	5160
	tcctccacgc	actatgtgct	tgagagcgac	gctgcagcac	gtgtcactca	gacccctctct	5220
	agltctacca	tcactcagct	gctgaagagg	cttcaccagt	ggatcaacga	ggactgctcc	5280
	acgccatgct	ccggtctcgt	gctaagagat	gtttgggatt	ggatatgcac	ggtgttgact	5340
	gatttcaaga	cctggctcca	gtccaagctc	ctgcgcgcat	tgccgggagt	ccctctcttc	5400
	tcattgtcaac	gtgggtacaa	gggagctctg	cggggcgacg	gcacatgca	aaccacctgc	5460
	ccatgtggag	ccagatcac	cggacatgtg	aaaaacgggt	ccatgaggat	cgtggggccc	5520
	aggacctgta	gtaacacgtg	gcattggaaaca	ttcccaatla	acgcgtacac	cacgggcccc	5580
	tgccagccct	ccccggcgcc	aaattattct	agggcgctgt	gggggggtgg	tgtctaggag	5640
	tacgtggagg	ttacgcgggt	gggggatttc	cactacgtga	cgggcagcac	cactgacaac	5700
	gtaaagtgcc	cgtgtcaggt	tcgggcccc	gaattcttca	cagaagtga	tgggggtcgg	5760
	ttgcacagg	acgctccagc	gtgcaaaacc	ctctacaggg	aggaaggtac	attcctgggt	5820
	gggtccaact	aatacctgg	tgggtcacag	ctcccatgag	agcccgaaac	ggagctagaa	5880
	gtgctcaact	ccatgctcac	cgacccctcc	cacattaccg	cggagacggc	taagcgtagg	5940
	ctggccagg	gatctccccc	ctccttggcc	agctcatcag	ctagccagct	gtctgcgcct	6000
	tccttgagg	caacatgcac	taccgctcat	gaactccccc	acgctgaact	catcgaggcc	6060
	aacctcctgt	ggcggcagg	gatggggcgg	aacatcaccc	gcgtggagtc	agaaaaaag	6120
	gtagttaatt	tggactcttt	cgagccgctc	caagcggagg	aggatgagag	ggaagtatcc	6180
	gttcggcg	agatcctcgg	gaggtccagg	aaattccctc	gagcgatgac	catatgggca	6240
	cgcgcggatt	acaaacctcc	actgttagag	tcctggaagg	acccggacta	agtcctctca	6300
	gtcgtacacg	ggtgtccatt	gcgcgctgac	aaggcccttc	cgtatccacc	tcacgggagg	6360
	aaggagcagg	ttgtctctgt	agaaatctac	gtgtctctct	ccttgccgga	gtctgcgaca	6420
	aagaccttcg	cgagctccga	atcgtcgccc	gtcgacagcg	gcacggcaac	ggcctctcct	6480
	gacacgccc	ccgacgavcg	vgacgagga	tcgacgctg	agtcgtactc	ctccatgccc	6540
	cccccttag	gggagccggg	ggatcccgat	ctcagcgagc	ggtcttggtc	taccgtaagc	6600
	gaggaggcta	gtgaggagct	cgtctgctgc	tcgatgtcct	acacatggac	aggcgccctg	6660
	atcacgccc	gcgctcgcca	ggaaaccaag	ctgcccatac	atgcactgag	caactctttg	6720
	ctccgtcac	acaaacttgg	ctatgttaca	acatctcgca	gcgcaagcct	gcggcagaag	6780
	aaggtcacct	ttgacgaact	gcaggctcct	gaagacccat	acggggagct	gctcaaggag	6840
	atgaaggcga	aggcgtccac	agtttaaggct	aaacttctat	ccgtggaggga	agcctgtaag	6900
	ctgacgcccc	cacattcgcc	cagatctaaa	tttggctatg	gggcaaaagg	cgtccggaac	6960
	ctatccagca	aggccgttaa	ccacntccgc	tcctgttgga	aggacttgc	ggaagacact	7020
	gagacaccaa	ttgacaccac	catcatggca	aaaaatgagg	tttctcgtgt	ccaaaccagag	7080
	aagggggggc	gcaagccagc	tcgccttata	gtattccacg	atttgggggt	tcgtgtgtgc	7140
	gagaaaatgg	ccctttacga	tgtggtcttc	accctccctc	aggccgtgat	gggctcttca	7200
	tcaggattcc	aatactctcc	tggacagcgg	gtcgagttcc	tggtagaatgc	ctggaaagcg	7260
	aagaaatgcc	ctatgggctt	cgcatalgac	accgctgtgt	ttgactcaac	ggtcactgag	7320
	aatgacatcc	gtgttgagg	gtcaatctac	caatgttgtg	acttggcccc	cgaagccaga	7380
	caggccataa	ggtcgctcac	agagcggctt	tacatcgggg	gccccctgac	taattctaaa	7440
	gggcagaaac	gcggctatcg	ccggtgcgc	gcgagcgggt	tactgacgac	cagctgcggt	7500

63			64			
aataccctca	catgttactt	gaagggcgt	gcggcctgtc	gagctgcgaa	gctccaggac	7560
lgcaccgalgc	tcgtatgcgg	agacgacctt	gtcgtllatct	gtgaaagcgc	ggggacccaa	7620
gaggacgagg	cgagcctacg	ggccttcacg	gaggctatga	ctagataactc	tgccccccct	7680
ggggacccgc	ccaaaccaga	atacgacttg	gagttgataa	catcatgctc	ctccaatgtg	7740
tcagtcgcgc	acgatgcata	tggcaaaagg	gtgtactatc	tcacccgtga	ccccaccacc	7800
ccocttgccg	gggctgcgtg	ggagacagct	agacacactc	cagtcgaattc	ctggctaggc	7860
aacatcatca	tgtatgcgcc	caccttgtgg	gcaaggatga	tectgatgac	tcattttcttc	7920
tccatccttc	tagctcagga	acaacttgaa	aaagccctag	attgtcagat	ctacggggcc	7980
tgttactcca	ttgagccact	tgacctacct	cagatcattc	aacgactcca	tggccttagc	8040
gcattttcac	tecatagtta	ctctccaggt	gagatcaata	gggtggcttc	atgcctcagg	8100
aaacttgggg	caccgccctt	gcgagtctgg	agacatcggg	ccagaagtgt	ccgcgctagg	8160
ctactgtccc	aggggggggag	ggctgccact	tgtggcaagt	acctcttcaa	ctgggcagta	8220
aggaccaagc	tcaaaactcac	tccaatcccg	gctgcgtccc	agttggattt	atccagctgg	8280
ttcgttgctg	gttacagcgg	gggagacata	tatcacagcc	tgtctcgtgc	ccgacccccc	8340
tgggttcatt	gggtgcctact	cctactttct	gtaggggtag	gcattctatct	actccccaac	8400
cgatgaacgg	ggagctaaac	actccaggcc	aataggccat	cctgtttttt	tccctttttt	8460
ttttttcttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	ctcctttttt	tttcctcttt	8520
ttttcttttt	ctttcttttg	gtggctccat	cttagcccta	gtcacggcta	gctgtgaaag	8580
gtccgtgagc	cgcttgactg	cagagagtgc	tgatactggc	ctctctgcag	atcaagt	8637

【0129】

【外10】

65

<210> 3
 <211> 8001
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

66

```

<400> 3
gccagccccc gattgggggc gacactccac catagatcac tcccctgtga ggaactactg 60
tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag ttctcgtgcag cctccaggac 120
ccccctcccc gggagagcca tagtggtctg cggaaacggg tagtacaccg gaattgccag 180
gacgacccgg tcccttcttg gatcaacccg ctcaatgcct ggagatttgg gogtgcccc 240
gogagactgc tagccagta gtgttgggtc gogaaaggcc ttgttggtact gctgatagg 300
gtgcttgcga gtgccccgg aggtctcgtc gaccgtgcac catgagcacy aatcctaaac 360
ctcaaaagaa aaccaaactg aacaccaacg ggcgcgccat gattgaacaa gatggattgc 420
acgcaggtto tccggocgct tgggtggaga ggotattcgg ctatgactgg gcaacaacga 480
caatcggctg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcaggggcgc ccggttcttt 540
ttgtcaagac cgaacctgtc gggtccctga atgaactgca ggacgaggca gcgcggctat 600
cgttgctggc cagcaggggc gtcccttgog cagctgtgct cgacgttgc actgaaggcg 660
gaaggagact gctgctattg ggcgaagtgc cggggcaggc tctcctgtca tctcaacctg 720
ctcctgccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcy gcggttgcac acgcttgatc 780
cggctacctg cccattcgac caccagcgca aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga 840
tggaaagccg tcttctcgat caggtatgat tggacgaaga gcatcagggg ctgcgcaccg 900
cggaaactgt cgcacggctc aaggcggcga tgcocgaagg caggatctc gtcgtgacc 960
atggcgatgc ctgcttgcg aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg 1020
actgtggcgg gctgggtgtg gcggacccgt atcaggacat agcgttgggt acccgtgata 1080
ttgctgaaga gcttggcggc gaattgggtc aocgcttctc cgtgctttac ggtatcgccg 1140
ctcccgattc gcagcgcatc gccctctata gccctcttga cagattcttc tgagtttaaa 1200
cagaaccaca cggtttccct ctaggcggat caattccgce cctctccctc cccccccct 1260
aaogttaact gccgaaggcg ctctggaataa ggcgggtgtg cgtttgccta tatgttattt 1320
tccaccatat tgcgttctt tggcaatgtg agggcccgga aacctggccc tgtctctctg 1380
acgagcattc ctagggtctc ttcctctctc gccaaaggaa tgcgaaggtc gttgaatgtc 1440
gtgaaggaa cagttctctc ggaagcttct tgaagcaaaa caacgtctgt agcgaacctt 1500
tgcagcagc ggaaaccccc accctggcgac aggtgcclct gcggccaaaa gccacgtgtc 1560
taagatcac ctgcaaaagg gcccaacccc cagtgcacg ttgtgagttg gatagttgtg 1620
gaaagagtoa aatgctctct ctoaaagcta ttoaaacagg ggcctgaagg tgcocagaag 1680
gtacccatt gtatgggata tgcctctggg cctcgggtga catgctttac atgtgtttag 1740
tcgaagttaa aaaaagctta ggcctccgca accacgggga cgtggttttc ctttgaaaaa 1800
cacgataata ccatggcgcc tattaaggcc tactcccaac agacgcaggg cctacttggc 1860
tgcatcatca ctagcctcac aggcggggac aggaaccagg tcgaggggga ggtccaaagt 1920
gtctccacc caacacaatc ttctctggcg acctgcgtca atggcgtgtg ttggactgtc 1980
tatecatgtg cggctcaaaa gaccttgcg gcccaaaagg gccaatcac ccaaatgtac 2040
accaatgttg accaggaact cgtcgggtcg caagcgcccc ccggggcgcg ttctctgaca 2100
ccatgcacct gggcagctc ggacotttac ttgttcaga ggaatgcga lgtcattcgg 2160
gtgcgcggcg gggcgacag cagggggagc ctactctccc ccaggcccggt ctctactctg 2220
aagggtctct cggcggtccc actgctctgc ccctcggggc acgctgttgg vatctltcgg 2280
gctgcogtgt gcacccgagg ggttcgaag gcggtggact ttgtacccgt cagttctatg 2340
gaaaccacta tgcggtcccc ggtcttcaag gacaaactct cccctccggc cglaccgcag 2400
acattccagg tggcccatct acacgccccct actggtagcg gcaagagcac taaggtgcg 2460
gctgcgtatg cagccaaagg gtataagggt cttgtcctga acccgtccgt cgcgcgccac 2520
ctaggtttcg gggcgtatat gtctaaggca catggtatcg accctaactc cagaaccggg 2580
gtaaggacca tcaaccaagg tgcccccac acgtactcca cctatggcaa gtttcttggc 2640
gacggtgtgt gctctggggg cgcctatgac atcataatat gtgatgagtg ccaactcaat 2700
gactcgacca ctatcctggg catcggcaca gtccctggac aagcggagac ggctggagcg 2760
cgactcgtcg tgcctgcac cgtcacgcct ccgggatcgg tcaccgtgcc acatccaaac 2820
atcgaggagg tggctctgtc cagcactgga gaaatccctt tttatggcaa agccatcccc 2880
atcgagacca tcaagggtgg gaggcacctc atttctctgc attccaagaa gaaatgtgat 2940
gagctcgccg cgaagctgtc cggcctcgga ctcaatgtct tagcalatta ccggggccct 3000
gatgtatccg tcataccac tagcggagac gtcatgtctg tagcaacgga cgtctaatg 3060
acgggttlla ccggcgtatt cgaactcagtg atcgaactga atacaaggtt caccagaca 3120
gtcgacttca gcttggaccc gaecttccac attgagacga cgaacgtgcc acaagacgg 3180
gtgtcacgct cgcagcgcg aggcaggact ggtaggggca ggaatggcat ttacaggttt 3240
gtgactccag gagaacggcc ctccggcatg ttcatctctc cggltctgtg cagtgcttat 3300
gacgcgggct gtgcttggta cgaactcag ccgcggcaga cctcagttag gttgcgggtc 3360
tacctaaaca caccagggtl gcccgltcgc caggaccatc tggagttctg yagagcgctc 3420
tttacaggcc taccaccaat agacgcccat ttcttctccc agactaagca ggcaggagac 3480
aatctccctc acctggtagc ataccaggct acggtgtgcy ccagggtcga ggtccacct 3540

```

【0130】

【外11】

67

uatcgtggg accaaatgtg gaagtgtctc atacggctaa agcctaogct gcacgggcca 3600
 augccctctgc tgtataggct gggagccgtt caaaacgagg ttactaccac acaccccata 3660
 accaaatata tcatggcatg catgtcggct gacctggagg tegtacagag caactgggtg 3720
 ctggtaggcn gagtccatagc agctctggcc gcgtatggcc tgacaacagg cagcgtggtc 3780
 atttggggca ggatcatcctt gtccggaaag ccggccatca ttcccgacag ggaagtccct 3840
 taccgggggt tcatggagat ggaagagtgc gcttcacacc tccctacac cgaacaggga 3900
 atgcagctng ccgaacaatt caaacagaag gcaatcgggt tgcctgcaac agcaaccaag 3960
 caagcggagg ctgctgctcc cgtgtggaa tccaagtggc ggaccctoga agcctctgg 4020
 gcgaagcata tgtggaattt catcagcggg atacaaatt tagcaggctt gtcaactctg 4080
 cctggcaacc ccggatagc atcactgatg gcattcacag cctctatcac cagcccgctc 4140
 accacccaac ataccctctt gtttaacatc ctggggggat ggggtggcgc caaacttctt 4200
 cctccagcgg ctgctctctg tttcgtaggc gccggcatcg ctggagcggc tgttggcagc 4260
 ataggccttg ggaagggtct tgttgatatt ttggcagggt atggagcagg ggtggcagg 4320
 ggcctcgtgg cctttaaggt catgagcggc gagatgccct ccaccgaggc cctggttaac 4380
 ctactcctctg ctatcctctc ccctggcgcc ctagtctgct ggtctgctg cgcagcgata 4440
 ctgctctggc acgtggggcc aggggagggg gctgtgaggt ggtgaaacg gctgatagc 4500
 ttctgctctg cgggtaacca cgtctccccc acgcactatg tgcctgagag cgcagctgca 4560
 gcaactgtca ctcatgctt ctctagtctt accatcact agctgctgaa gaggcttacc 4620
 cagtggatca accgaggctg ctccacgcca tgcctcgggt cgtggctaug agatgtttgg 4680
 gattggatat gcacgggtgtt gactgatttc aagacctggc tccagtccaa gctcctgccc 4740
 cgttggccgg gagtccctct ctctcatgt caacgtgggt acaaggaggt ctggcggggc 4800
 gcaggcatca tgcacaaccac ctgcccattgt ggaacaaaga tcaaccggaca tgtgaaaaa 4860
 ggttccatga ggaactgtgg gctaggacc tgtagtaaca cgtggcatgg aacattcccc 4920
 attaaacgct acaccacggg cccctgcacg cctcctcccg ccgcaaatka ttctagggcg 4980
 ctgtgggggg tggctgtctga ggagtacgtg gagggttaac ggggtggggg ttcccaactc 5040
 gtgacgggca tgcacactga caacgttaag tgcccgtgtc aggttccggc ccccgaaatc 5100
 ttccacagaag tggatgggggt gcggttgcaac aggtacgctc cagcgtgcaa acccctccta 5160
 cgggaggagg tcaactcctt ggtcgggctc aatcaatacc tggttgggtc acagctccca 5220
 tgcgagcccg aaccggacgt agcagtgtct acttccatgc tcaaccgacc ctccacatt 5280
 accgcgagga cggctaagcg taggtctggc aggggatctc cccctcctt ggcaggtca 5340
 tcaactagcc agctgtctgc gcttccctt aaggcaacal gcaactcccg tcatgaatcc 5400
 ccggagcgtc acctcatcga ggcacaacct ctgtggcggc aggaagatgg cgggaaatc 5460
 acccgctgg agtcagaaaa taaggtagta atttggact ctttcgagcc gctccagcg 5520
 gaggaggatg agggggaggt atccgttccg ggggagatcc tgcggagggt caggaaatc 5580
 cctcgagcga tgcacatag ggcacgccc galtaacac ctccactgtt agagtctgg 5640
 aaggaccccg actacgtccc tccagtggtc caccgggtgtc cattgcggcc tgcgaaggc 5700
 cctccgatac caactccacg gagggaaggg acggttctcc tgcagaatc taccgtgtct 5760
 tctgctctgg cggagctcgc caaaaagacc ttccggcagct ccgaatcgtc ggcgtctgac 5820
 agcggcagcg caacggcctc tccgtgcccag cctccgacg accggcagcg gggatccgac 5880
 gctgagctgt actcctccat gccccccctt gagggggagc cgggggatcc cgtatccagc 5940
 gtcgggtctt ggtctaccgt aagcgaggg gctagtgagg acgtcgtctg ctgctcgtg 6000
 tctacacat ggacaggggc cctgatcagc ccatgctgt cggaggaaac caagctgcc 6060
 atcaatgcac tgagcaactc ttgtctccyl caccacaact tgggtctatg tacaacatct 6120
 cgcagcgcaa gcttgcggca gaagaaggto acctttgaca gactgcagggt cctggacgac 6180
 caactacggg acgtgctcaa ggagatgaag gcgaayggc ccacagttaa ggctaaactt 6240
 ctatccgttg aggaagcctg taagctgacg ccccaacatl cggccagatc taaatttggc 6300
 tatggggcaa aggaagctcg gaacctatcc agcaaggcgg ttaaccacat ccgctccgtg 6360
 tgggaaggact tgcctggaaga cactgagaca ccaatttgaca ccaccatcat ggcaaaaaat 6420
 gagggtttct cgttccaaac agagaagggg ggcggcaagc cayctcgctt tatcgtatto 6480
 ccagatttgg ggttctgtgt gtgcgagaaa atggcccltt acgatgtggt ctccaacctc 6540
 cctcaggcgg tgatgggctc ttcatcggga ttccaatacl ctctggaca ggggtcgag 6600
 ttctctgtga atgcttgaa agcgaagaaa tgcctatgg gcttcgata tgaccaaccg 6660
 tgttttgact caacgggtcac tgagaaatgac atccgtgttg agggatcaat ctaccaatgt 6720
 tgtgacttgg ccccgaaagc cagacaggcc ataaggctgc lccagagcg gctttacatc 6780
 gggggccccc tgaactaattc taaaggcgag aactgcggct atcgccgtg ccgcccagc 6840
 ggtgtactga cgaacagctg cggtaatacc ctccatgtt acttgaagg cgtgcggcc 6900
 tgcagagct cgaagctcca ggactgcag atgctcgtat cgggagacga ccttctcgtt 6960
 atctgtgaaa gcgcggggac ccaagagagc gaggcgagcc tacgggctt caggaggct 7020
 atgactagat actctgcccc ccttggggac ccgcccacac cagaalacga cttggagttg 7080
 ataacatcat gctcctccaa tgtgtcagtc gcgcacgag catctggcaa aagggtgtac 7140
 tatctcacc gtgacccac caacccctt gcgggggtg cgtgggagac ctttctcgtt 7200
 actccagtc atctctggct aggcacatc atcatgtatg cgcacactt gtcgggcaagg 7260
 atgactctga tgaactattt ctctccatc cttctagctc aggaacaccl lyaanaagc 7320
 ctgattgtc agatctacgg ggcctgttac tccattgagc caetlgaccl acctcagatc 7380
 attcaacgac tccatggcct tagcgcattt tccctccata gttacclcc aggtgagatc 7440
 aatagggtgg cttcatgctt caggaaaact ggggtaccgc ctttgcgagt ctggagacat 7500

68

【0131】

40 【外12】

cgggcoagaa gtgtccggc taggtactg tcccagggg ggagggtgc caactgtggc 7560
 aagtaacctc tcaactgggc agtaaggacc aagctcaaac tcaactccat cccggtctgc 7620
 tccagttgg attatccag ctggtctgt gctggttaca gcgggggaga catatcac 7680
 agcctgtctc gtgcccagc ccgctggttc atgtgtgccc tactcctact ttctgtagg 7740
 gtaggcatct atctactccc caaccgatga acggggagct aaacactcca ggccaatag 7800
 ccatoctgtt ttttccctt tttttttt tttttttt tttttttt tttttttt 7860
 ttttctctt ttttttctt cttttttt tttttttt tttttttt tttttttt 7920
 cctagtcaag gctagctgt aaaggctcgt gagccgctt actgcagaga gtgctgatac 7980
 tggcctctc gcagatcaag t 8001

【0132】

【外13】

<210> 4
 <211> 7989
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

<400> 4
 gccagccccc gattqggggc gacactccac catagatcac tcccctgtga ggaactactg 60
 tcttcaacgca gaaagcgctc agccatggcg ttagtatgag tgtcgtgcag cclccaggac 120
 ccccccctccc gggagagoca tagtggtctg cggaaacggg tagtacaccg gaattgccag 180
 gacgaccggg tccllclclg galcaaccg ctaaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
 gcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgttggtact gccctgtagg 300
 gtgtttgcga gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagccag aatccataac 360
 ctcaaaagaaa aaccaaggcg cgcgccatga ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc 420
 cggccgcttg gtgtgagagg ctattcggct atgactgggc acaacagaca atcggctgct 480
 ctgatgcgcg cgtgttccgg ctgtcagcgc agggcgccgc ggtctctttt gtcaagaccg 540
 acctgtccgg tgccttgaat gaactgcagg acgagggcgc gcggctatcg tggctggcca 600
 cgacggggcg tcccttgcca gctgtgctcg acgtttgtac tgaagcggga agggactggc 660
 tgcatttggg cgaagtgcgg gggcaggatc tctgtctate tcaaccttgc cctgcccaga 720
 aagtatccat catggtgat gcaatgcggc ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc 780
 ccttgcccca ccaagcgaaa catcgcatcg agcgagcacg tactcggatg gaagccgggc 840
 ttgtcgatca ggtatgatcg gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc gaaatgttgc 900
 ccaggtctcaa ggcgcgcagc ccgcagcgcg aggatctcgt cgtgacccat ggcgatgcct 960
 gcttgccgaa tatcatgttg gaaaatggcg gcttttctcg attcatcgac tgtggccggc 1020
 tgggtgtggc ggaacgctat caggaacatag cgttggctac ccttgatatt gctgaagagc 1080
 ttggcggcga atgggtgac cgttctctcg tgccttaccg tatcgccgct cccgattcgc 1140
 agcgcatcgc cttctatcgc cttcttgacg agtcttctcg agtttataca gaccacaacg 1200
 gtttccctct agcgggatac attccgcccc tctccctccc cccccctaaa cgttactggc 1260
 cgaagccgct tggaaaggg ccggtgtgtcg ttgtctata tgttattttc caccattatg 1320
 ccgtcttttg gcaatgtgag ggcggcgaaa cctggccctg tcttcttgac gacattcct 1380
 aggggtcttl cccclctcgc caaggaatg caaggtctgt tgaatgtcgt gaaggaagca 1440
 gttcctctgg aagctcttg aagacaaca acgtctgtag cgaccttgg caggcagcgg 1500
 aacccccccac ctggcgacag gtgcctctgc ggcacaaagc cacgtgtata agatacacct 1560
 gcaaaggcgg cacaacccca gtgccacgct gtgagttgga tagttgtgga aagagtcaaa 1620
 tggctctcct caagcgtatt caacaaggcg ctgaaggatg cccagaaggt accccattgt 1680
 atgggatctg atctggggcc tccgtgcaca tgccttacct gtgttttagt gaggttaaaa 1740
 acggtctagg cccccgaac acggggagcg tggttttcct ttgaaaaaca cgataataac 1800
 atggcgccca ttacggccca ctcccaacag acgcgagggc tacttggctg catcatcact 1860
 agctctacag gccgggacag gaaccaagtc gagggggagg tccaagtgtg tccacccgca 1920
 acacaatctt ccttgccgac ctgcgtcaat ggctgtgttt ggaactgtct tcatggtgac 1980
 ggctcaaaag ccttggccgg cccaaaggcg ccaatcaccc aaatgtacac caatgtggac 2040
 caggacctcg tggctggca agcgcctccc ggggcgcgct ccttgacacc atgcacctg 2100
 ggagctcgg acctttactt ggtcaagagg catgcccagc tcaatccggt cgcgcggcgg 2160
 ggcgacagcg gggggagcct actctcccc aggcctctct cctacttgaa gggctctc 2220
 ggcggtccac tgcctgccc ctccggggcac gctgtgggca tcttccgggc tgcctgtgac 2280
 acccgagggg ttggaaaggg ggtggacttt gtacccctcg agtctatgga aacccatag 2340
 cggctcccgg tcttcaagg caactcgtcc cctccggccg taccgcagac attccagggt 2400
 gcccctctac acgcccctac tggtagcgcc aagagcacta aggtgcccgg tgcgtatgca 2460
 gcccagggt ataagggtct tgcctgaac ccgtccgtcg ccgccacct aggtttcggg 2520
 gcgtatatgt ctaaggcaca tggtagcag cctaaccatca gaacccgggt aaggaccatc 2580
 accacgggtg ccccatcac gtaactccac tatggcaagt ttcttgccga cgggtggtgc 2640
 tctggggggc cctatgacat cataatatgt gatgagtgcc actcaactga ctgcacact 2700
 atcctgggca tccgacaggt cctgyaucaa gcygagacgg ctggagcggc actegtcgtg 2760
 ctcgccaccg ctacgctcc gggtatcggt accgtgccac atccaaacat cgaaggagtg 2820
 gctntgtcca gcaotggaga aatccctttt tatggcaag ccatcccat cgaagccatc 2880
 aaggggggga ggcacctcat ttctgcccac tccaagaaga aatgtgatga gctcgcggcg 2940
 aagctgtccg gcctcggaat caatgctgta gcataattacc ggggccttga tgtatccgtc 3000
 acaccaacta cgggagacgt catgtgtgta gcaacggagc ctctaattga gggctttacc 3060
 ggcgatttgc actcagtgat cgaactgcaat acatgtgtca cccagacagt cgaactcagc 3120
 ctggaccgca ccttcacatc tagagcagac accgtgccac aagacggcgt gtcaogctcg 3180
 cagcggcgag gcaggactgg taqggggcagg atgggcattt acaggtttgt gactccaggga 3240
 gaacggccct cgggcatgtt cgaattcccg gttctgtgog agtgcctatga cgcgggctgt 3300
 gcttgggtacg agctcagcgc cgcggagacc tcaagttaggt tgcgggctta cctaacaca 3360
 ccagggttgc ccgtctgcca ggaactctg gacttctggg agagcgtctt tacaggcctc 3420
 accacatag acgcccattt cttgtccag actaagcagg caggagacaa cttccctac 3480
 ctggtagcat accaggctac gctgtgcgc agggctcagg ctccacctcc atcgtgggac 3540

71

caaatgtgga agtctctcat acggctaaag cctacgctgc acggggccaaac gcccctgctg 3600
 tataggcttg gaggcgttca aaacgaggtt actaccacac accccataac caaatacatc 3660
 atggcatgca tgcgggtga cctggaggtc gtcacgagca cctgggtgct ggtaggcgga 3720
 gtccatagcag ctctggcgcg gtattgctctg acaacaggca gcttggtcat tctgggcagg 3780
 atcatcttct cgggaagacc ggccatcatt cccgacaggg aaglccltta ccgggagttc 3840
 gatgagatgg aagagtgcgc ctcaacctc ccttacatcg aacagggaat gcagctcgcc 3900
 gaacaattca aacagaaggg aatcgggttg ctgcaaacag ccaccaagca agcggaggct 3960
 gctgctcccg tgggtgaatc caagtggcgg aacctogaag ccttctgggc gaagcatatg 4020
 tggaaattca tcagcgggat acaatattia gcaggtctgt ccactctgcc tggcaacccc 4080
 gcgatagcat cactgatggc attcacagcc tctatcacca gcccgctcac caccacaacat 4140
 accctcctgt ttaacatcct ggggggagtg gtggcgcgcg aacttgctcc tccagcgct 4200
 gcttctgctt togtaggcgc cggcatcgct ggagcggctg ttggcagcat aggccttggg 4260
 aaggtgcttg tggatatttt ggaggttat yggaggggg ttggcagggc gctcgtggcc 4320
 ttttaaggta tgagcggcga gatgccctcc accgaggacc tgggttaacct actccctgct 4380
 atoctctccc ctggcgccct agtctgctgg gtctgtgctg cagcgatact gctcgggca 4440
 gtggggccag gggagggggc tgtgcagtgg atgaaccggc tgatagcgtt cgtctcgccg 4500
 ggttaaccag tctccccac gcaatctgtg cctgagagcg acgctgcagc acgtgtcact 4560
 cagatcctct ctagtcttac catcactcag ctgtctgaag ggcttcacca gtggatcaac 4620
 gaggaotgct caacgcctat ctccggctcg lggctaaag atgtttggga ttggatatgc 4680
 acggtgttga ctgatttcaa gacttgctc cagtccaagc tctgcccgcg attgcccggg 4740
 gtccctctct tctcatgtca acgtgggtac aaggaggtct ggccggggcg cggcatcatg 4800
 caaaccacct gccatgtgg agcacagatc accggacatg tgaanaacgg tccatgagg 4860
 atogtggggc claggacct tagtaacacg tggcatggaa cattccccat taacgcgtac 4920
 accacgggcc cctgcaacgc ctccccggc ccaattatt ctaggcgct gtggcggtg 4980
 gctgctgagg agtacgtgga ggttacgcgg gtgggggatt tccactacgt gacggycatg 5040
 accactgaca agttaaagt cccgtgtcag gtccgggcgc ccgaattctt cacaagaagt 5100
 gatggggctg ggttgacag gtacgttcca cgttgcaaac cctctctacg ggagaggctc 5160
 acattctctg tgggtctcaa tcaatacctg gttgggtcac agctcccatg cgagcccgaa 5220
 ccggagctag cagtgtctac tctcatgtcc acugacccct cccacattac ggcggagacg 5280
 gctaagctga ggttgccag gggatctccc cctctcttgg ccagctcatc agctagccag 5340
 ctgtctgcgc ctctctttaa ggcaacatgc actaccctc atgactcccc ggacgtgac 5400
 ctcatcgagg ccaacctctc gtggcgccag gagatggcg ggaacatcac ccggtggag 5460
 tcaaaaaata aggtagtat tttggactct tctgagcgcg tccaaaggga ggaagatgag 5520
 agggaggtat cgtgtccggc ggagatctcg cggaggtcca ygaattccc tccagcgatg 5580
 cccatgtggc cagccccgga ttacaacctg ccactgttag agtccctgga ygaacccgga 5640
 tacgtctctc cagtgttaca cgggtgtcca ttgcccctg ccaaggcccc tccgatacca 5700
 cctccacgga ggaagaggac ggttgtctcg tcaaatcta ccgtgtctc tgccttggcg 5760
 gagctccgca caaagacct cggcagctcc gaatctgctg ccgtcgacag cggcacggca 5820
 accgctctc ctgaccagcc ctccgacgac ggcgacgcgg gatccgact tgaagctgac 5880
 tctctcatg cccctcttga gggggagccg ggggactccc atctcagcga cgggtcttgg 5940
 tctacgttaa gcgaggaggc tagtgaggac gctgtctgct gctogagtgc ctacaatgg 6000
 acaggcgccc tgatcacgac atgctgtgct gaggaaacca agctgcccc caatgcactg 6060
 agcaactctt tgcctccgta ccaaaccttg gtctatgcta caacatctcg cagcgcaagc 6120
 ctgcccagga agaaggtcac ctttgacaga ctgcaagctc tggacgacca ctacggggac 6180
 gtgtccagg agatgaaggc gaaggcgtcc acagttaagg ctataactct atccgtggag 6240
 gaagctgta agctgacgca cccacattcg gccagatcta aatttggtca tggggcagg 6300
 gacgtccgga acctatccag caaggccgll aaccacatcc gctccgtgtg gaaggacttg 6360
 ctggaagaca ctgagacacc aattgacacc accatcatgg caaaaaatga ggttttctgc 6420
 gtccaaaccag agaagggggc ccgcaagcca gctgcctta tegtattccc agaltlggg 6480
 gttcgtgtgt gcgagaaaat ggcctcttac gatgtgtct ccaacctccc tccaggccgtg 6540
 atgggtctct catacggatt ccaatactct cctggacagc gggtcgagtt cctgggtgat 6600
 gcttggaag cgaagaaatg cctatggggc ttccgatatg acccccgctg ttttgactca 6660
 acggtcactg agaatgacat cctgtgttag gactcaatct accaatgttg tgaattggcc 6720
 cccgagccca gacagggcat aaggctgctc acagagcggc ttatcatcgg gggccccctg 6780
 actaattcta aagggcagaa ctgcccgtat cgcgggtgac gcgcgagcgg tgaactgacg 6840
 accagctgag gtaataccct cacatgttac ttgaaggcgg ctgcccctg tccagctgag 6900
 aagctccagg actgcaagat gctcgtatgc ggagacgacc ttgtcgttat ctgtgaaagc 6960
 gcggggcccc aagaggacga ggcgagccta cgggcttca cggagggcat gactagatac 7020
 tctgcccccc ctggggaccc gcccaacca gaatacgaat tggagttgat aacatcatg 7080
 tcttccaatg tgtcagtcgc gcaagatgca tctggcaaaa ggggtgacta tctcaacccg 7140
 gacccccaca ccccccttg gcgggctgag tgggagacag ctagacacac tccagtcaat 7200
 tccgtgctag gcaacatcat catgtatgag ccaaccttgi gggcaaggat gatcctgatg 7260
 actcatttct tctccatctc tctagctcag gaacaaactg aaaaagccct agattgtcag 7320
 atccacgggg cctgttactc cattgagcca cttgacctac ctcatatcat tcaacgactc 7380
 calgggctta gcgcatttct actccatagt tactctccag gtgagatcaa taggggtgct 7440
 tcatgctca ggaaccttgg ggtaccgccc ttgagagctc ggagacatcg ggccaagat 7500

72

【0134】

gtcggcgcta ggetactgtc ccaggggggg agggctgcca cttgtggcaa gtacctctc 7560
 aactggggcag taaggaccaa gctcaaacct actccaatcc cggctgcgtc ccagttggat 7620
 ttatccagct ggttctgttc tgggttacagc gggggagaca tatatcacag cctgtctcgt 7680
 gcccgacccc gctggttcat gtggttccca ctctacttt ctgtagggtt aggcactctat 7740
 ctactcccca accgatgaac ggggagctaa aactccagg ccaataggcc atctgtctt 7800
 ttttcccttt ttttttctt ttttttttt ttttttttt ttttttttt tttctcttt 7860
 ttttctctt ttttttctt ttttttctt ttttttctt atcttagccc tagtccagc 7920
 tagctgtgaa aggtccgtga gccgcttgac tgcagagagt gctgatactg gctctctgc 7980
 agatcaagt 7989

40 【外15】

【0135】

【外16】

73

<210> 5
 <211> 8649
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

<400> 5

```

gccagccccc gattgggggc gacactccac catagatcac tccccgtgtg ggaactactg 60
tcttcacgca gaaagcgctc agccatggcg ttatgtatgag tgtcgtgcag cctccaggac 120
ccccctccc gggagagcca tagtgtgtct cggaaaccgtt gagtacaccg gaattgccag 180
gacgacccgg tcccttcttg gatcaaccgc ctcaatgcctt ggagatttgg gcgtgcccc 240
ggcagactgc tagccgagta gtgttgggtc gogaaaggcc ttgtggtact gcctgatagg 300
gtgcttgcga gtgccccggg aggtctctga gaccgtgcac catgagcacg aatcctaacc 360
ctcaaaagaa aaccaaacyt aacaccaacg ggcgcgcctt gattgaacaa gatggattgc 420
acgcagggtt tccggccgct tgggtggaga ggcatttcgg ctatgactgg gcacaacaga 480
caatcggctg ctctgatgac gccctgttcc ggcctgtcagc gcagggggcg ccggttcttt 540
ttgtcaagac cgaacctgtc ggtgcocctg atgaactgca ggcagaggca gcggtgttat 600
cgttggctggc cagcaacggc gtctcttgcg cagctgtgtc cgcggttctc actgaagcgg 660
gaagggaactg gctgctattt ggcgaagtgc cggggcaggga tctcctgtca tctcaccctg 720
ctcctgcgca gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggtgcctt acgcttgatc 780
cggctaccctg cccattcgac caccagcgca aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga 840
tggaaagccg tcttctcgat caggatgacg tggacgaaga gcacagggg ctcgcgcagg 900
ccgaactgtt cgcacggctc aagcgcgcca tgcgcgaagg cgaggtatct gtcgtgaccc 960
atggcgatgc ctgcttgcgc aatatcatgg tggaaaaatg ccgcttctct ggattcatcg 1020
actgtggcgg gctgggtgtg gcggacgcgt atcaggaact agcgttggct acccgtgata 1080
ttgttgaaga gcttggcgcg aactgttctt accgttctct cgttcttctc ggtatcgccg 1140
ctcccgattc gcagcgcatc gccctctctc gcccttctga cgcgttctct tggatttaaa 1200
cagaccacaa cgglttctcc ctgacgggat caattccggc cctctcctcc cccccccctt 1260
aacgttactg gccgaagcgc cttggaataa ggcgggtgtg cgttcttctc tatgttattt 1320
tccacacata tgccttctct tggcaatgtg agggcccgga aacctggccc lgtcttcttg 1380
acgagcattc ctagggtgtc ttccccctcc gccaaaggaa tgcaggtctt gttgaatgtc 1440
gtgaaggaa gcaattctct ggaagcttct tgaagacaaa caactgtctt agcgaacctt 1500
tgcaggcgag ggaacccccc acctggcgac aggtgctctt cgggccaaaa ggcacglgta 1560
taagatacac ctgcaaaagg ggcacacccc cagtgcacag ttgtgagttg gatagttgtg 1620
gaagagtgca aatggctctc ctcaacagga tccaacaagg ggtgaagga tgcacagaag 1680
gtaccccatc gtatgggata tcatctgggg cctcgggtga catgctttac atgtgtttag 1740
tcgaggttaa aaaaagctca ggccccccca accacgggga cgtggttttc ctttgaaaaa 1800
cacgataata ccattgacgg ggagatggca gcaatgtggc gaggcgcggt ttctgtaggt 1860
ctgatactct tgacctgttc acctgactat aagctgttcc tgcctaggct catatggtgg 1920
ttacaatat tlatcacag ggcggaggca caactgcaag tgtggaatcc cccctcaac 1980
gttcgggggg gcccgagatg cgtatctctc ctacgtgccc cgtacacccc agagctaatc 2040
tttaccatca ccaaaatctt gctcgccata ctgggtccac tcatggtgnt ccaggctggt 2100
ataaccaaag tgcgtactt cgtgcgcgca caggggtcca ttctgtcatg catgctggtg 2160
cggaaaggtt ctgggggtca ttatgtccaa atggctctca tgaagtggc cgcactgaca 2220
gglaagctac ttatgacca tctcaaccca ctgcgggact gggccacgc gggcctaaga 2280
gaaccttcgg tggcagttga gcccgctctc tctctgata tggagaccaa ggttatcacc 2340
tggggggcag acacgcggc gtgtggggac atcatcttgg cctgccccgt ctccgcgcgc 2400
agggggaggg agatacatct gggacccgca gacagccttg aagggcaggg gtggcgactc 2460
ctogcgocca ttacggocca ctcccaacag acgcgaggcc taettggctg cateactact 2520
agcctcacag gccgggacag gaacacggtc gagggggagg tcaaagtggt ctccacgcga 2580
acacaaatct tcttggcgac ctgcgtcaat ggcgtgtgtt ggaactgtct tcatggtgac 2640
ggctcaaaag ccttgcggc cccaaagggc caaatcacc aaatgtacac caatgtggac 2700
caggaccttc lcygclgyc aycgcgcccc gggcgcgctt ccttgacacc atgcacctgc 2760
ggcagctcgg acctttactt ggtacagagg cgtgcgatg tcatccgggt gcgcggcgcg 2820
ggcgacagca gggggagcct actctccccc aggcctgctt cctacttgaa ggcctcttcg 2880
ggcggtccac tgcctctccc ctccggggcac gctgtgggca tctttcgggc tgcctgtgtc 2940
aaccgagggg ttgcgaaggg ggtggaottt gtaoccgtag agtotatgga aaccactatg 3000
cggctcccgg tcttcacgga caactcgtcc cctccggcgg taccgcagac altccaggctg 3060
gccccatctc acgccccac tggtagcggc aagagcacta aggtgcgggc tgcglatgca 3120
gccccagggt ataaaggtct tgtcctgaac cgttccgtcg ccgccacctt aggtttcggg 3180
gcgtatatgt cttaaggcaca tggatctgac cctaactaca gaacgggggt aaggaccatc 3240
acacagggty cccccacac gtactccacc tatggcaagt ttcttgcgga cgggtggttcg 3300
tctggggggc cctatgacat caaatatgt gatgagtgcc actcaactga ctogacacat 3360
atcctgqcca tgcgcacagt cctggaccaa gcggagacgg ctggagcycg actcgtcgtg 3420
ctgcgcacgg ctacgcctcc gggatcggtc accgtgccac atccaaacat cgaagaggtg 3480
gtctcttcca gcaactggaga aatccccctt talygaaag ccatccccat cgagaccatc 3540

```

74

75					76
aagggggggg	ggcaccatcat	tttctgcat	tccaagaaya	aattgtgatga	gctcggccgg
aagctgtccg	gacctggact	caatgctgta	gcataattacc	ggggcccttga	tgatccgctc
ataccaaacta	gaggagacgt	cattgtcgta	gcaacgggaug	ctctaatgac	gggctttacc
ggcgattttcg	ucltugtgat	cgactgcaat	acatgtgtca	cccagacagt	cgactttacc
ctggacccga	ccttcaacat	tgagacgacg	acgggtccac	aagacggcgt	gtcagcgtcg
cagcggcgag	gcaggactgg	tagggcgag	atgggcat	acaggtttgt	gactccagga
gaauvgccct	cgggcatgtt	ngattccctcg	gttctgtgag	agtgtcatga	cgccggcgtt
gcttgggtacg	agctcaacgc	cgccgagacc	tcagtttagt	tgccggctta	cctaaacaca
ccagggltgc	ccgtctgcca	ggacatctcg	gagttctggg	agagcgtctt	tacaggcctc
ucccacatag	acgcccattt	cctgtccag	actaagcagg	caggagacaa	cctccctac
ctggtagcat	accaggctac	gggtgtcgcc	agggctcagg	ctccacctcc	atugtgggac
caaatgttga	agtgtctcat	acggctaaag	cctacgctgc	acgggccaac	gcccctgctc
tataggctcg	gagccgttca	aaacgaggtt	actaccacac	accccataac	caaatatcat
atggcatgca	tgctcggtga	cctggaggtc	gtccagagca	cctgggtgct	ggtaggggga
gtccacagca	ctctggccgc	gtattgcctg	acaacaggca	gcgtggctcat	tgtagggcag
atcatctctgt	ccggaaagcc	ggccatcatt	cccgacaggg	aagtccctta	ccgggagltc
galagagatgg	aagagtgcgc	ctccacccctc	ccttaccatcg	aacagggaat	gcagctcgcc
gaacaaattca	aacagaagcc	aatcggtgtg	ctgcaaacag	ccaccaagca	agcggaggct
gctgtccccc	tggtggaatc	caagtggcgg	acccctgaag	cctctgtggc	gaagcctatg
tggaatttca	tcagcgggat	acaatattta	gcaggctgtg	ccactctgcc	tggaaccccc
gcgtagcat	cactgtatgg	attcacagcc	tctatcccca	gcccgcctac	cacccaacat
accctccctgt	ttaacatcct	ggggggatgg	gtggcccgcc	aacttgctcc	tccagcgctc
gcttctgctt	tcgtaggcgc	cgccatcgct	ggagcggctg	ttggcagcat	aggccttggg
aaggltgcttg	tggtatattt	ggcaggttat	ggagcagggg	tgccagggcg	gctcgtggcc
tttaaggctca	tgagcggcga	gatgcctctc	accgaggacc	tggttaacct	actccctgct
atccctctccc	ctggccgccc	agtcgtcggg	gtcgtgtgag	cagcgatact	gctcggccac
gtggggccag	gggggggggc	tgtagcagtg	atgaacgggc	tgatagcgtt	cgtttcgccg
ggtaaccacg	tctcccccac	gcactatgtg	cctgagagcg	acgtgtcagc	acgtgtcact
cagatctctct	ctagtcttac	calcuactcag	ctgctgaaga	ggcttcacca	gtggatccac
gaggactgct	ccagcccatg	ctccggctcg	tggttaagag	atgtttggga	ttggatatgc
acggtgttga	ctgatttcaa	gaactggctc	cagtcacagc	tccgtcccgcc	attgcccggga
gtccctctct	tctcatgtca	acgtgggtac	aagggtatct	ggcggggcga	cggcatcatg
caaaaccact	gcccattgag	agcacagatc	accggacatg	tgaaaaacgg	ttccatgagg
atcgtggggc	ctaggacctg	tagtaaacag	tgccatggaa	cattcccat	taacgcgtac
accacggggcc	cctgcacggc	ctcccccggc	ccaaattatc	ctaggggcgt	gtggcggttg
gctgtcaggg	agtcacgtga	gggttaacgg	gtgggggatt	tcactacgt	gacgggcatg
accactgaca	acgtlaaagt	cccggtgcag	gttccggccc	ccgaattctt	cacagaggtg
gatgggtgct	gggttgcaac	gtacgctcca	gogtgcaaac	ccctccatag	ggaggaggtc
acattccctgg	tcgggctcaa	lcaataacctg	gttgggtcac	agctcccatg	cagaccgcaa
ccggacgtag	cagtgtctac	ttccatgctc	accgacccct	ccacacattac	ggcggagagc
gctaagcgta	ggctggccag	gggatctccc	ccctcccttg	ccagctccac	agctagccag
ctgtctgcgc	cctccctgaa	ggcaacatgc	actacccgtc	atgactcccc	ggagcctgac
ctcatcgagg	ccaaacctct	gtggcggcag	gagatggggc	ggaaactcac	ccgcgtggag
tcagaaaaata	aggtagtta	tttggactct	ttcgagccgc	tccaagcggg	ggaggatgag
agggaggtat	ccgttccggc	ggagatccct	cggaggctcca	ggaaattccc	tcagagcgtg
cccatatggg	cacgcccggg	ttacaaacct	ccactgttag	agtcctggaa	ggacccggac
taagttccctc	cagtgtgaca	cgggtgtcca	ltgcgccttg	ccaaggcccc	tcagatacca
cctccacgga	ggaaagggac	gggtgtctct	tcagaatcta	ccgtgtcttc	tcctctggcg
gagctccgca	caaaagacctt	oggcagctcc	gaatcgtcgg	ccgtcgacag	cggacccgca
acggcctctc	ctgacacgcc	ctccgacgac	ggcgacggcg	gatccgacgt	tgagtcgtac
tctccatgc	ccccccttga	gggggagccg	ggggatcccg	atctcagcga	cgggtctltg
tctacngtaa	gcgaggagggc	tagtgaggac	gtcgtctgct	gtctgaagtc	ctacacatgg
acaggcgccc	tgatccagcc	atgocgtgag	gaggaaacca	agctgcccac	caatgcactg
agcaactctt	tgctccgtca	ccacaacttg	gtctatgcta	caacatctcg	cagcgcaagc
ctgocggcaga	agaaggtcac	ccttgacaga	ctgcaggltc	lggacgacca	ctacccggac
gtgtccagg	agatgaaggc	gaaggcgtcc	acagtttaagg	ctaaactctt	atccctggag
gaagcctgta	agctgacgac	ccacacattc	gccagatcta	aatttggcla	tgggggcaag
gacgtccggg	acotatccag	caaggccgtt	aaccacatcc	gctcgtgtgt	gaaggacttg
ctggaagaca	ctgagacacc	aattgacacc	acatcatggg	caaaaaatga	ggttttctgc
gtcccaacag	agaagggggg	cgcgaagcca	gctcgcctta	tcglatlcac	agatttgggg
gtcgtgtgt	gcgagaaaal	ggccclliac	gatgtgtgtc	ccacccctcc	tcaggccgtg
atgggtctct	catacggatt	ccaaatctct	cctggacagc	gggtcaggtt	cctgggtgaat
gcttggaag	cgaagaaatg	ccctatgggc	ttcgcalalg	acaccccgct	ttttgactca
acgggtcactg	agaatgacat	ccgtgttgag	gagtcacatc	accaatgttg	tgaactggcc
cccgagccca	gacagggcat	aaggtcgctc	acagagcggc	tttaccatcg	gggcccclcg
actaattcta	aagggcagau	ulgccgttat	cgcgggtgac	gcccagcgcg	tgtactgacg

77				78			
accagctgcy	gtaataccct	cacatgttac	ttgaaggccg	ctgcggcctg	tcgagctgcy	7560	
aagctccagg	actgcaegat	gctcgtatgc	ggagacgacc	ttgtcgttat	ctgtgaaagc	7620	
gcggggaccc	aagaggacga	ggcgagccta	cgggccttca	cggaggctat	gactagatac	7680	
tctgcccccc	ctggggaccc	gccccaaacca	gaatacgact	tggagttgat	aacatcatgc	7740	
tcttccaatg	tgtcagtcgc	gcacgatgca	tctggcaaaa	gggtgtacta	tctcaccctg	7800	
gacccccacca	cccccttgc	gctggctgcy	tgggagacag	ctagacacac	tccagtcaat	7860	
tcttggctag	gcaacatcat	catgtatgcy	cccaccttgt	gggcaaggat	gatcctgatg	7920	
actcattttct	tctccatcct	tctagctcag	gaacaacttg	aaaaagccct	agattgtcag	7980	
atctacgggg	cctgttactc	cattgagcca	cttgacctac	ctcagatcat	tcaacgactc	8040	
catggcctta	gogcattttc	actccatagt	tactctccag	gtgagatcaa	taggggtggct	8100	
tcatgectca	ggaaacttgg	ggtaccgccc	ttgcgagtct	ggagacatcg	ggccagaagt	8160	
gtccggccta	ggctaactgtc	ccaggggggg	agggctgcca	cttgtggcaa	gtacctcttc	8220	
aaotgggcag	taaggaccaa	gctcaaaactc	actccaatcc	cggctgcgtc	ccagttggat	8280	
ttatccagct	ggttcgttgc	tggttacagc	gggggagaca	tatatcacag	cctgtctcgt	8340	
gcccgaacccc	gctggttcat	gtggtgccta	ctectacttt	ctgtaggggt	aggcatctat	8400	
ctactcccca	accgatgaac	ggggagctaa	acactccagg	ccaataggcc	atcctgtttt	8460	
tttccctttt	tttttttctt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	ttctcctttt	8520	
tttttctctt	ttttttcctt	ttctttcctt	tgggtggctcc	atcttagccc	tagtccagggc	8580	
tagctgtgaa	aggtccgtga	gccgcttgac	tgcagagagt	gctgatactg	gcctctctgc	8640	
agatcaagt						8649	

【0138】

【外19】

<210> 6
 <211> 8001
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

<400> 6

```

gccagccccc gattgggggg gacactccac catagatcac tccccgtgga ggaactactg 60
tcttccagca gaaagcgctc agccatggcg ttagtatgag tgtcgtgcag cctccaggac 120
ccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaacggg gagtaacacg gaattgccag 180
gacgaccggg tcttttcttg gatcaacccg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
gacgagactgc tagccagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtgttact gctgatagg 300
gtgtcttgcga gtccccggg aggtctctga gaccgtgcac catgagcacg aatcctaacc 360
ctcaaaagaa aaccaaagct aacaccaacg ggcgcgccat gattgaacaa gatggattgc 420
acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga 480
caatcggtcg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcaggggggc ccggttcttt 540
ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca ggaugagga gcgcgggtat 600
cgtggctggc caccaggggc gttcccttgc cagctgtgct cgacgttctc actgaagcgg 660
gaaggagactg gctgctactg ggcgaagtgc cggggcaggga tctcctgtca tctcaccttg 720
ctcctgccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggctgcat aocgttgatc 780
cggctacctg cccattcgac caccagcgga aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga 840
tggtaagccg tcttgtcgat caggatgata tggacgaaga gcatcagggg ctgcgcgag 900
cggaaactgt cgcaggctc aaggcgcgca tgcgcgagcg cgaggatctc gtcgtgaccc 960
atggctgactg ctgcttggcg aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg 1020
actgtggcgg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggct acccgtgata 1080
ttgtctgaaga gcttggcggc gaatgggctg accgcttctc cgtgtcttac ggtatcgccg 1140
ctcccgatttc gcagcgcatc gcccttctat gcccttctga cagattcttc tgagttttaa 1200
cagaccacaa cggtttccct cttagcgggat caattccgcc cctctccctc cccccccct 1260
aacgttactg gcgcaagccg cttggaaataa ggcgggtgtg cgtttgtcta tatgttattt 1320
tccaccataa tgcggtcttt tggcaatgtg agggcccgga aacctggccc tgtcttcttg 1380
acgagcattc ctagggtgtc ttccctctcc gccaaaggaa tgcgaaggtc gttgaatgtc 1440
gtgaaggaa gctgtctctc ggaagcttct tgaagacaaa caacgtctgt agcgacccct 1500
tgcaaggcag ggaacccccc acctggcgac aggtgcctct gcggccaaaa gccacgtgta 1560
taagatacac ctgcaaggcc ggcaacaacc cagtgcacag ttgtgagttg gatagtgttg 1620
gaaagagtca aatggctctc ctcaagcgta ttcaacaagg ggtgaagga tgcacagaag 1680
tgacccattt gtatgggata tga tctgggg cctcgtgtca catgtcttac atgtgtttag 1740
tcgaaggtaa aaaaactcta ggcgcccgca accacgggga cgtgttcttc ctttgaaaaa 1800
cacgataata ccatggcgcc tattaacggc taactccaac agacgcgagg cctacttggc 1860
tgcatacata ctagectcac aggcggggac aggaaccagg tcgaggggga ggtccaagtg 1920
gtctccaccc caacacaatc ttctctggcg acctgcgtca atggcgtgtg ttggactgtc 1980
tatcatgttg ccggctcaaa gacccttgcc ggcccaagg gcccaatcac ccaaatgtac 2040
accaatgttg accaggaccc cgtcggctgg caagcgcccc ccggggcgcg ttcccttgaa 2100
ccatgcacct ggcgcagctc ggacctttac ttgttcacga ggcattgccga tgtcattccg 2160
gtgcgcggcg ggggcgacag caggggggagc ctactctccc ccaggcccg ctcctacttg 2220
aagggtctct cggggcggtc actgctctgc cctcggggc atgtgtgtgg catcttctgg 2280
gctgcgctgt gcaccggagg ggttgcgaag gcgttggaat ttgtacccg caggtctatg 2340
gaaacccacta tgcggtcccc ggtcttccag gacaaactgt cccctccggc cgtacccgag 2400
acattccagg tggcccatct acacgcccc actggttagcg gcaagagcac taagggtgac 2460
gctgcgcatg cagcccaagg gtataagggt cttgtctctga acccgtccgt cgcgcgccac 2520
ctaggtctct ggcgctatat gtctaaggca catggtatcg accctaact cagaaccggg 2580
gtagggacca tcaccacggg tgcctccatc acgtactcca cctatggcaa gtttcttgcc 2640
gacggtggtt gctctggggg ccctatgac atcataatat gtgatgagtg ccaactcaact 2700
gactcgacca clatcctggg catcgggaca gtcctggacc aagcggagac ggctggagcg 2760
cgactcgtcg tgcctcgccc cgtacgacct ccgggatcgg tcaccggtgc acatccaaac 2820
atcgaggagg tggctctgtc cagcaactgga qaactccct tttatygcaa agucalccc 2880
atcgcgacca tcaagggggg gaggcacctc atttctctgc attccaagaa gaaatgtgat 2940
gagctcgccg cgaagctatc cggcctcgga ctcaatgtcg tagcatatta ccggggcctt 3000
gattgtatcc tcataccnac tagcggagac gtcattgtcg tagcaacgga cgtctaatg 3060
acgggcttta ccggcgattt cgtactcagt atcgactgca atacatgtgt caccagaca 3120
gtcgacttca gctggacccc gaccttcaac attgagacga cgaccggtcc acaagacgcy 3180
glqfcaagct ogcagcgggc aggcaggact ggtgggggca ggaaggcat ttacaggttt 3240
gtgactccag gagaacggcc ctggggcatg ttcgattcct cggctctgtg cgagtgtat 3300
gacgcgggct gtccttggtg ccggtccagc cctcagtlag gllgagggt 3360
tacctaaaca caccagggtc gccgtctgca caggacatc tggagtctg ggagagcgt 3420
tttacaggcc tcaccacat agacgcccat ttcttgtccc agactaggca ggcaggagac 3480
aacttcccc acctgctagc ataccaggct acgggtgtcg ccagggtcca ggctccacct 3540

```

81					82
ccatcgtggg	accaaagtgt	ggagtgtctc	atacggctaa	agcctacgct	gcacgggccc
acgcccctgc	tgtataggct	gggagccgtt	caaaacgagg	ttactaccac	acaccccata
accaaataca	tcattggcat	catgtcggcc	gaactggagg	tcgtcacgag	caactgggtg
ctggtagggc	gagtcctagc	agctctggcc	gcgtactgcc	tgacacagg	cagcgttggtc
attgtgggca	ggatcactct	gtccggaaag	ccggccatca	ttcccgacag	ggaagtccct
tacccggagt	togatgagat	ggaagagtcg	gcctcacacc	tccttlaac	cgaaacggga
atgcagctcg	ccgaacaatt	caaacagaa	qcaatcgggt	tgctgcaaac	agccaccag
caagcggagg	ctgctgtctc	cggtgtggna	lccaaagtgc	ggaccctcga	agcctctctg
gcgaagcata	tgaggaaatt	catcagcggg	atacaatatt	tagcaggctt	gtccactctg
cctggcaacc	ccgcgatagc	atcaatgatg	gcattcacag	cctctatcac	cagcccgctc
acaccccaac	ataccctcct	gtttaacatc	ctggggggat	gggtggccgc	ccaaactlgt
cctcccagcg	ctgcttctgc	tttcgtaggc	gcgggcctcg	ctggagcggc	tggtggcagg
ataggccttg	ggaaggtgct	tggtgatatt	ttggcagggt	atggagcagg	ggtggcaggc
gcgctcgtgg	cctttaaggt	catgagcggc	gagatgccct	ccacagagg	cctgggtaac
ctactccctg	ctatccctctc	cctggcgccc	ctagtctctg	gggtctgtgt	cgacagcata
ctgcgtcggc	acgtggggcc	aggggagggg	gctgtgcagt	ggatgaaccg	gctgatagcg
ttcgtcttgc	ggggttaacca	cgctctcccc	acgcactatg	tgctctgagag	cgacgctgca
gcacgtctga	ctcagatcct	ctctagtctt	accatcactc	agctgctgaa	gaggctctac
cagtggtatca	acgaggactg	ctccacggca	tgctccggct	cgtggctaa	agatgtttgg
gattggtatc	gcactgtgtt	gaactgtatc	aagacotggc	tcaggtocaa	gctcctgocg
cgattgcggc	gagtcctcct	cttctcatgt	caacgtgggt	acaaggagg	ctggcggggc
gacggcatca	tgcaaacacc	ctgcccctgt	ggagcacaga	tcacccggca	tggtgaanaa
ggttccatga	ggatcgtggg	gcctaggacc	tgtagtaaca	cgtggcatgg	aacattcccc
attaaacgct	acacacaggg	ccctcgcaag	ccctccccgg	cgccaaatta	ttctagggcg
ctgtggcgag	tggtcgtgta	ggagtacgtg	gaggttaacg	gggtggggga	tttccactac
gtgacgggca	tgacacactga	caacgtaaag	tgcccgctgt	aggttccggc	ccccgaattc
ttcacagaa	tggtgggggt	gcgggtgcac	aggtacgctc	cagcgtgcaa	acccctccta
cgggaggagg	tcacatccct	ggtygggctc	aatcaatacc	tggttgggtc	acagctccca
tgccggcccg	aacccggacgt	agcagtgctc	acttccatgc	tcacccgacc	ctccacattt
acggcgagga	cggttaagcg	taggctggcc	aggggatctc	ccccctcctt	ggccagctca
tcagatagcc	agctgtctgc	gccttccctg	aaggcaaac	gcactacccg	lcatgaotcc
ccggacgctg	acctcatcga	ggccaacctc	ctgtggcggc	aggagatggg	cgggaacatc
accccgctgg	agtcagaaaa	taaggtagta	atthtggacc	ctttcgagcc	gctccaaagc
gaggagtagt	agagggaagt	atccgttccg	gcggagatcc	tgccggaggtc	caggaaattc
cctcgagcga	tgcccatatg	ggcacgccc	gattacaacc	ctccactgtt	agagtccctg
aaggaccggc	actacgtccc	cccagtggtg	cacgggtgtc	catttgcggc	tgccaaaggcc
cctccgatac	caactccacg	gagggagagg	acgggtgtcc	tgctcagaatc	taacgctgtc
tcctgcttgg	cggagctcgc	cacaaagacc	ttccgcagcc	ccgaatogtc	ggccgctcgac
agcggcagcg	caacggcctc	tcctgaccag	ccctccgagc	acggcgagcg	gggatccgac
gttagtctgt	actcctccat	gccccccctt	gagggggagc	cgggggatcc	cgatctcagc
gaocggcttt	ggtctaccgt	aagcagagg	gctagttagg	acgtcgtctg	ctgctogatg
tcctacacat	ggacagggcg	cctgatcacg	ccatgcgctg	cggaggaaac	caagctgccc
gtcaatgac	tgagcaactc	tttgctccgt	caccacaact	tggtctatgc	tacaacatct
gcagcgcda	gcctgcggca	gaagaaggtc	acctttgaca	gactgcagg	cctggacgac
cactacccgg	acgtgctcaa	ggagatgaag	gcgaaggcgt	ccacagttaa	ggctaaactt
ctatccgtgg	aggaagcctg	taagctagag	ccccacattt	cggccagatc	taaaatttggc
tatggggcaa	aggacgtccg	qaacatctcc	agcaaggccg	ttaaaccacat	cgcctccgtg
tggaaggact	tgctggaaga	cactgagaca	ccaattgaca	ccaccatcat	ggcaaaaaat
gaggtttctt	gcgtcccaacc	agagaagggg	ggccgcgaagc	cagctcgcct	tatcgtattc
ccagatttgg	gggttctgtg	gtgcgagaaa	atggcccttt	acgatgtggt	ctccacccctc
cctcagggcg	tgatgggctc	ttcatacgga	ttccaatact	ctcctggaca	gcgggtcgag
ttcctgtgtg	atgcctggaa	agcgaagaaa	tgccctatgg	gcttcgcata	tgacacccgc
tggtttgact	caacggtcac	tgagaatgac	atccgtgttg	aggagtcaat	ctaccaatgt
tggtgacttg	cccccgaaag	cagacaggcc	ataaggtcgc	tcacagagcg	gctttacatc
ggggggcccc	tgactaatlc	taaaaggcag	aaclgcggct	algcgggtg	cgcgcgagc
gggtactcga	cgacccagctg	cggtaatacc	ctcacatgct	atthtgaagg	cgcctgggcc
tgctgagctg	cgaagctcca	ggactgcacg	atgctcgtat	gcggagacga	ccttgccttt
atctgtgaaa	gcgcggggac	ccaagaggac	gagcgagcc	taagggcctt	cacggaggct
atgaactagat	actctgcccc	ccttggggac	cgcgcccaac	cagantacga	cttggagttg
ataacatcat	gctcctccaa	tggtgcagtc	gcgcacgatg	catctggcaa	aagggtgtac
tatctcacc	gtgacccccc	caacccccc	gcgcgggctg	cgtgggagac	agctagacac
actccagtc	attcctggct	aggcaacatc	atcatgtatg	cgcaccaact	gtgggcaagg
atgatcctga	tgactcattt	cttctccatc	cttctagctc	aggaacaaact	tgaaaaagcc
atgatctgic	agacccacgg	ggcctgttac	tcatttgagc	cactlgaact	acctcagatc
atccacacgc	tcacatggct	tagcgcattt	tcactccata	gttactctcc	aggtgagatc
aatagggctg	cttccatgcct	caggaaactt	gggttacccg	ccttgcaggt	ctggagacat

【0140】

cgggccagaa	gtgtccgcgc	taggctactg	tcaccagggg	ggagggctgc	cacttgtggc	7560
aagtacctct	tcaactgggc	agtaaggacc	aagctcaaac	tcactccaat	cccggtctgc	7620
tcacagttgg	atttatccag	ctggttctgt	gcgggggaga	catatatcac		7680
agcctgtctc	gtgcccagac	cgcgtggttc	atgtgggtgc	tactcctact	ttctgtaggg	7740
gtaggcatct	atctactccc	caacccgatga	acggggagct	aaacactcca	ggccaatagg	7800
ccatcctgtt	tttttccctt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	7860
tttttctcct	tttttttctt	atthtcttcc	tttttcttcc	tttgggtggt	ccatcttagc	7920
cctagtccag	gctagtctgt	aaaggtccgt	gagccgcttg	actgcagaga	gtgctgatac	7980
tgccctctct	gcagatcaag	t				8001

【0141】

【外22】

<210> 7
 <211> 11076
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

<400> 7

```

gccagccccc gatgggggg gacactccac catagatcac tcccctgtga ggaactactg 60
tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgtcgtgcag cctccaggac 120
ccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaaccgg gagtacaccg gaattgccag 180
gaagaccggg tcttttcttg gatcaaccgg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
gcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtggtact gcctgatagg 300
gtgcttgcga gtgccccggg aggtctcgtc gaccgtgcac catgagcacg aatcctaacc 360
ctcaaagaaa aaccaaactg aacaccaacg gccgcgcgat gattgaacaa gatggattgc 420
acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga 480
caatcggtcg cctctgatcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcaggggcgc ccggttcttt 540
ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgcoctga atgaactgca ggacgaggca gcgcgctat 600
cgtggctggc cagcaggggc gtteecttgc cagctgtgct cgaactgttc actgaaggcg 660
gaagggaact gctgtatttg ggcgaaagtc cggggcagga tctcctgtca tctcaccttg 720
ctcctgcgca gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gccgctgcac acgcttgatc 780
cggctacctg cccatttcgac caaccaagca aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga 840
tggaagcctg tcttctcgtc caggatgata tggacgaaga gcatcagggg ctgcgcacg 900
ccgaactgtt cgcacggctc aaggcgcgca tgcccgacgg cagggatctc gtcgtgaccc 960
atggcgatgc ctgcttgcg aabatactgg tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg 1020
actgttgccg cctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggct acccgtgata 1080
ttgctgaaga gcttggcgcg gaatgggctg accgcttctc cgtgctttac ggtatcgccg 1140
ctcccgatcc gcagcgcatc gccctctatc gcttcttga cgagtcttcc tgagttataa 1200
cagagccaaa cggtttccct cagcgggat caattccgcc cctctccctc cccccccct 1260
aacgttactg gccgaagccg cttggaaataa ggccggtgtg cgtttgtota tatgttattt 1320
tccaccatat tgcgctcttt tggcaatgtg agggcccgga aacctggccc tgtctcttgg 1380
acgagcattc ctagggtctc ttccctctc gccaaaggaa tgcaggtctc gttgaatgtc 1440
gtgaagggaag cagttcctct ggaagctctc tgaagacaaa caacgtctgt agcgaccctt 1500
tgagggcagc ggaacccccc acctggcgac aggtgcctct gccgcacaaa gccacgtgta 1560
taagatacac ctgcaaaagg gcacacccc cagtgcacg ttgtgagttg gatagttgtg 1620
gaaagagtc aatggctctc ctcaagcgta ttcaacaagg ggctgaagga tgcccaagaa 1680
gtaccccatc gtatgggac tgatctgggg cctcggtgca catgctttac atgtgtttag 1740
tcagagttaa aaaacgtcta ggcacccgga accacgggga cgtgttttcc ctttgaataa 1800
cacgataata ccatgggcac gaatccataa cctcaagaa aaaccaaacg taaccaaac 1860
cgccgccccc aggaagtcac gtcccccggc ggtggtcaga tcgtcggtgg agtttaccg 1920
ttgccgcgca gggcccccag gttgggtgtg cgcgcgacta ggaagacttc cgagcggtcg 1980
caacctcgtg gaaggcgaca acctatcccc aaggctcgcc agcccgaggg tagggcctgg 2040
gctcagcccg ggtacccctg gccctctatc ggcaatgagg gcttgggggt ggccaggtcg 2100
cctcgtctac cccgtggctc tgggcttagt cggacccccc cggacccccc gcgtaggtcg 2160
cgcaatttgg gtaaggtcat cgtaccctc acgtgcggct tcgccgatct catggggtac 2220
attccgctcg tcggcgcccc cctagggggc gctgccaggg cctggcgcca tggcgctcgg 2280
gttctggagg acggcgtgaa ctatgcaaca gggaaatctg ccggttctc ctttctctc 2340
ttccttttgg ctttgcgtgc ctgtttgacc atcccagctt ccgcttatga agtgcgcaac 2400
gtatccggag tgtaaccatgt caggaacgac tgctccaacg caagcattgt gtatgaggca 2460
gcggacatga tcatgcatac ccccggtgct gtgcccgtg ttccggagaa caactcctcc 2520
cgctgctggg tagcgctcac tcccacgctc gccgcagga acgctagcgt ccccaactacg 2580
acgatacgac gccatgtcga tttgctcgtt ggggcggctg ctctctgctc cgtatgtac 2640
gtgggagatc tctgcgatac tgttttctc gtcgcccagc tgttcaacct ctcgctctgc 2700
cggcacgaga cagtacagga ctgcaattgc tcaatatatc ccggccacgt gacaggtcac 2760
cgtatggctt gggatatgat gatgaactgg tcacctacag cagccctagt ggtatcgag 2820
tactccggga tcccacaagg tgtcgtggat atgggtggcg gggeccattg gggctccta 2880
gcgggccttg cctaetattc catgggtggg aactgggcta aggttctgat tgtgatgcta 2940
ctctttgcgg gcgttgacgg gggaaacctat gtgacagggg ggaagatggc caaaaaacac 3000
ctcgggatta cgtccctctt ttcaaccggg tcatccagga aaatccagct tgtaaaacc 3060
aacggcagct ggcacatcaa caggactgcc ctgaactgca atgactccct caacactggg 3120
ttccttgcgt cgctgttcta cgtgcacaa gttcaactat ctggatgccc agagcgcatc 3180
gccagctgca gcccatoga cgggttcgct cagggtgggg ggccatcac ttacaatgag 3240
tcacacagct cggaccagag gccttattgt tggcactacg cccccggcc gtgcggtatc 3300
qlaccgcggc cgcaggtgtg tggctcagtg tactgcttca ccccaagccc tgtcgtggtg 3360
gggacgaccg accggttcgg cgtccctacg tacagttggg gggagaatga gacggacgtg 3420
ctgcttctta acaacacggg gccgcgcaa ggcaactggg ttgctgtac atggalgaat 3480
agcaclqqtt tcaaccaagc gtgcgggggc ccccgctgta acatcggggg gatcggaat 3540

```

[illegible]

87

gtgtgcgcag cgatactgag tgggcacgtg ggcacagggg agggggctgt gcagtggatg 7560
 aacgggctga tagcggttcg ttccgggggt aaccacgtct cccccacgca ctatgtgtct 7620
 gagagcgacg ctgcagcacg tgtcactcag atcctctcta gtcttaccat cactcagctg 7680
 ctgaagagggc ttccaccagt gatcaacgag gactgtctca cgcctatgccc cggctcgttg 7740
 ctaagagatg tttgggattg gatatgcacg gtgttgactg atttcaagac ctggctccag 7800
 tccaagctcc tgcgcgcatg gccgggagtc ccttctctct catgtcaacg tgggtacaag 7860
 ggagttctggc ggggcgacgg catcatgcaa accacctgcc catgtggagc acagatcacc 7920
 ggacatgtga aaaacggttc catgaggatc gtggggccta ggacctgtag taacacgtgg 7980
 catggaacat tccccattaa cgcgtacacc acggggccct gcacgcccct cccggcgcca 8040
 aattattcta gggcgctgtg ggggttggct gctgaggagt acgtgagagt taccggggtg 8100
 ggggatttcc actacgtgac gggcatgacc actgacaacg taaagtgcct gtgtcaggtt 8160
 ccggcccccg aattcttcac agaagtggat ggggtgcggt tgcaacaggt cgctccagcg 8220
 tgcaaacccc tctacggga ggaggtcaca ttcttggctg ggtcfaatca atacctggtt 8280
 gggtcacagc tcccatggg gcccgaaacg gactgagcag tgtcactctc catgtctacc 8340
 gacccctccc acattacggc ggagacggct aagcgtaggg tggccagggg atctccccc 8400
 tcttgggcca gctcatcagc tagccagctg tctgcgctt ccttgaaggc aacatgcact 8460
 acccgctatg actccccga cgtgacctc atcgaggcca acctcctgtg gcggcaggag 8520
 atgggcggga acatcacccg cgtggagtca gaaaataagg tagtaattct ggactcttcc 8580
 gagcgctcc aagcggagga ggatgagagg gaagtatcgg tcccgcgcca gatcctgctg 8640
 aggtccaggga aattccctcg agcgtgccc atatgggacg gcccgatta caacctcca 8700
 ctgttagagt cctggaaagg ccgggactac gtccctcag tggtacacgg gtgtccattg 8760
 ccgctgcca agcccccctc gatccacct ccacggaggg agaggacggc tgcctctgca 8820
 gaatctacgg tctctctgct cttggggagg ctggccacaa agacctctcg cagctccgaa 8880
 tcttggccgg tcgacagcgg cagggcaacg gctctcctg accagccctc cgcgacggc 8940
 gacgggggat ccgacgttga gtctactcc tccatgcccc ccttggaggg ggagccgggg 9000
 gatcccgatc tcagcgaagg gtcttggctt accgttaagg agggaggtag tgggacgtc 9060
 gctctgtgct cgtgtccta cacatggaca ggcgcctcga tcccgccatg tcccgccatg 9120
 gaaaccaagg tgcctgtcaa tgcactgagc aactctttgc tccgtcacca caacttggct 9180
 tatgtctaca catctcgacg cgaagcctg cggcagaaga aggtcacctt tgacagactg 9240
 cagggtctgg acgaccacta cgggacgtg ctcaaggaga tgaaggcgaa ggcgtccaca 9300
 gtttaaggcta aacttctatc cgtggaggaa gcctgttaag tgacgcccc acattcggcc 9360
 agatctaaat ttggctatgg ggcacaaggc gtccggaaac tatccagcaa ggcgttaac 9420
 cacatccgct ccgtgtggaa ggacttctg gaagacactg agacaccaat tgacaccacc 9480
 atcatggcaa aaaatgaggt ttctctgctg caaccagaga agggggggcg caagccagct 9540
 gcatatgaca tcttcccaqa tttgggggtt cgtgtgtgcg agaaaaatgg cctttacgat 9600
 gtgtgtctcca cctccctca ggcgtgatg ggtcttctat acggattcca ataactctct 9660
 ggaacagcgg lcgagltcct ggtgaatgcc tggaaagcga agaaatgccc tatgggcttc 9720
 gcatatgaca cccgtgtttt tgactcaacg gtcactgaga atgacatccg tgttgaggag 9780
 tcaatctacc aatgttgtga cttggcccc gaagccagac aggccataag gtcgctcaca 9840
 gagcggcttt acatcgggg cccctgact aattctaaag ggcagaactg cggctatcgc 9900
 cgttgcggcg cgaaggtgt actgacgacc agctgaggta ataocctcac atgttatttg 9960
 aaggccgtg cggcctgtg agctgcgaag ctccaggact gcacgatgct cgtatgcgga 10020
 gagacacttg tctgtatctg tgaagcggc gggacccaag aggcagaggc gagcctacgg 10080
 gcttccagg aggttatgac tagatactct gcccccctg gggacccgcc caaacagaa 10140
 taagacttgg agttgataac atcatgctcc tccaatgtgt cagtgcgcca cgtatgctct 10200
 ggcacaaagg tgtactatct caccctgac cccaccacc ccttgcgcg ggcgtgctgg 10260
 gagacagcta gacacactcc agtcaatccc tggctaggca acatcatcat gtatgcgccc 10320
 accctgtggg caaggatgat cctgatgact cacttctctt ccatcctctt agctcaggaa 10380
 caacttgaaa aagccctaga ttgtcagatc taaggggcct gttactccat tgagccactt 10440
 gacctacctc agatcattca acgactccat ggcttagcg cactttcact ccatagtta 10500
 tctccagggt agatcaatag ggtggttca tgcctcagga aacttgggtt accgcccctg 10560
 cgagtctgga gacatcgggc cagaagtgtc cgcgttaggc tactgtccca gggggggagg 10620
 gctgcaactt gtygcaagta cctcttcaac tgggcagtaa ggaaccaagt caaactcact 10680
 ccaatcccg ctcgctccca gtttgattta tccagctggt tccgttctgg ttacagcggg 10740
 ggagacatat atcacagcct gtctcgtgcc cgaacccgct ggttcatgtg gtgcctactc 10800
 ctactttctg taggggtagg catctatcta ctcccaacc gatgaacggg gacttaaca 10860
 ctccaggcca ataggccatc ctgttttttt cctttttttt ttttcttttt tttttttttt 10920
 tttttttttt tttttttttt tctttttttt tctttttttt tttttttttt tttttttttt 10980
 tggctccatc tttagccatg tcaaggtatg ctgtgaaagg tccgtgagcc gcttgactgc 11040
 agagagtgtc gatactggcc tctctgcaga tcaagt 11076

88

<210> 8
 <211> 8001
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

<400> 8

```

gacacccccc gattggggggc gacacccccc catagatcac tccccctgtga ggaactactg 60
tcllccaccca gaaagcgtctt agcccatggcg ttagtatgag tgtcgtgcag cctccaggac 120
ccccccctccc gggagagacca tagtgggtctg cggaaacgggt gagtacaccg gaattgccag 180
gacgacccggg tcccttctctg gatcaaccgg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
gcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtggtact gctgatagg 300
gtgcttgcca gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagcag aatcctaaac 360
ctcaaaagaaa aaccaaaccgt aacaccaacg ggccgcgccat gattgaacaa gatggattgc 420
acgcagggttc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gaacaacaga 480
caatcgccgtg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcaggggcgc cgggttcttt 540
tthgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca ggacgaggca gcgcggctat 600
cgtggtctggc caacgacggg gttccttggc cagctgtgct cgaactgttc actgaagcgg 660
gaaggagactg gctgctattg ggccgaagtgc cggggcaggga tctcctgtca tctcaacttg 720
ctctcgcgcga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggctgcat acgcttgatc 780
cggatcaactg cccattcgac caaccaagca aacatcgcat cgaagcagca cgtactcgga 840
tggaagccggg tcttctcgat caggatgac tggacgaaga gcatcagggg ctcgcggcac 900
ccgaactgtt cgccaggctc aaggcgcgca tgcccgacgg caggatctc gtcgtgaccc 960
atggcgactgc ctgottgccc aatatcatgg tggaaaaatgg ccgcttttcc ggattcatcg 1020
actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggct acccggtgata 1080
ttgctgaaga gcttggcggc gaattggctg accgcttctc cgtgctttac ggtatcgccg 1140
ctcccgattc cgacgcgcat gcctctctac gccttcttga cgaacttttc tgagtttaaa 1200
cagaccacaa cgggttccct clagcgggat caattccgcc cctctcctcc cccccccct 1260
aacgttactg gccgaagccg cttggaataa ggccgggttg cgtttgtcta tatgttattt 1320
tccaccatac tgcgctcttt tggcaatgtg agggcccgga aactcggccc tgtcttcttg 1380
acgacatttc ctacgggtct ttccctctc gccaaaggaa tgcaaggtct gttgaatgtc 1440
gtgaaggagc cagttcctct ggaagcttct tgaagacaaa caacgtctgt agcgaacctt 1500
tgacggcagc ggaacccccc acctggcgac aggtcctct gcggccaaaa gccacgtgta 1560
taagatacac ctgcaaaagg gcacaaaccc cagtgcacgg ttgtgagttg gatagtgtg 1620
gaaagagtc aatggctctc ctcaagcgta ttoaacagg ggtlgaaggga tgccagagag 1680
gtaccacatt gtatgggata tgatctgggg cctcgggtga catgctttac atgtgtttag 1740
tcgaggttaa aaaaactcta gggcccccga accacgggga cgtggttttc ctttgaaaaa 1800
cacgataata ccatggcgcc tattacggcc taactccaac agaagcgagg cctacttggc 1860
tgcatatca ctatgcctac aggcggggac aggaaccagg tcgaggggga ggtccaagtg 1920
gtctccacgg caacaaatcc tttcctggcg acctgcctca atggcgtgtg ttggactgtc 1980
tatcatgggt ccggtcaaaa gaccttggcc ggcacaaagg gccaatcac ocaaatgtac 2040
accaatgttg accaggacct cgtcggctgg caagcggccc ccggggcgcg ttccttgaca 2100
ccatgcacct gcggcagctc ggaactttac ttgttcacga ggcatgcga tgtcattccg 2160
gtgcgcggcg ggggcgacag cagggggagc ctactctccc ccaggcccg ctactacttg 2220
aagggtcttt cgggcggctc actgctctgc cctcggggc agcctgtggg catctttcgg 2280
gctgcgctgt gcacccgagg ggttcggaag gcggtggaat ttgtaccggt caggtctatg 2340
gaaaccacta tgcgggtccc ggtcttcacg gacaactcgt cccctcggcg cgtacogcag 2400
acattccagg tggcccatct acacgccctc actggtagcg gcaagagcac taagggtccg 2460
gctgcgtatg cagcccaagg gtataaggty ctltgctctga acctgcctgt agccgacacc 2520
ctaagtttcc gggcgatatat gtctaaaggca catggtatcg acctaaact cagaatcggg 2580
gtaaggacca tcaccaaggg tgcccccac acgtactcca cctatggcaa gtttcttgcc 2640
gacggtgggt gctctggggg cgcttatgac atcataatat gtyatgagtg ccaactcaact 2700
gactcgacca ctatcctggg catcggaaca gtccctggacc aagcggagac ggtcgagcg 2760
ggaactgtcg tgcctgcccac cgctacgctc cggggatcgg tcaccggtgc acatccaaac 2820
atcgaggagg tggctctgtc cagcactgga gaaatccct tttatggcaa agcatccccc 2880
atcgagacca tcaagggggg gaggcacctc atttctgccc attccaagaa gaaatgtgat 2940
gagctcgccg cgaagctgtc cggcctcgga ctcaatgctg tagcatatta ccggggcctc 3000
yatgtatccg tcataccaac tagcggagac gtcaltgtcg tagcaacgga cgtctaatg 3060
acgggcttta ccggtgactt cgaactcagt atcgaactga atacatgtgt caccagaca 3120
gtcgacttea gcctggaccc gaacttcacc attgagagca cgaacggtgc acaagacggg 3180
gtgtcacgtc cgcagggggg aggcaggact ggtaggggca ggalgggcat ttacaggttt 3240
gtgactccag gagaacggcc ctccggcatg ttcgattccc cggttctgtg caggtgctat 3300
gacggggggt gtgcttggtg cgaactcacy ccgucgaga cctnarttag gttcggggct 3360
tacotaaaa caccagggtt gccgctctgc caggaccatc tggagttctg yagagggctc 3420
tttaacggcc tcacccacat agacggccat ttcttctccc agactaagca ggcaggagac 3480
aacttccctc acctggttagc ataccaggct aagggtgtg caggggatca ggtccacct 3540

```

91

ccatcgtggg accaaatgtg gaagtggttc aacggccta agcctaagct gcaagggcca 3600
 accgcccctgc tctatagggc gggagccgtt caaaacgagg ttactaccac acaccccata 3660
 tcaatggcag catgtcgggt gacgtggagg tegtcaagag caactgggtg 3720
 ctggtagggc gaggcctagc agctctggcc gcgtattgac tgacaacagg cagcgtgggc 3780
 attgtgggca ggtccatcct gtcgggaaag cgggccatca ttcccgacag ggaagtcctt 3840
 taacgggagt tcatgagat ggaagagtg gctcacacc tccctacat ogaacaggga 3900
 atgcagctcg ccgaacaaat caaacagaag gcaatcgggt tgcgcacaac agccaccaa 3960
 caagcggagg ctgctgctcc cgtggcggaa tccaagtggc ggaccatcga agcctctctg 4020
 gcgaagcata tctggaattt catcagcggg atacaattt tagcaggctt gtcacactctg 4080
 cctggcaacc ccgcgatagc atcacgatg gattcacag cctctatcac cagcccgctc 4140
 accaccccaac ataccctcct gtttaacatc ctggggggat gggcggccgc ccaacttgct 4200
 cctcccaagc ctgctctctg tttcgtaggc gccggcatcg ctggagcggc tgttggcagc 4260
 ataggccttg ggaaggctgt ttggatatt ttggcagggt atggagcagg ggtggcaggc 4320
 gogctcgttg cctttaaggc catgagcggc gaggatccct ccacagaggc cctggttaac 4380
 ctatccctcc cctcgccgc ctagtctcg ggtcgtgtg cgcagcga cgcagcga 4440
 ctgcgtcggc acgtgggccc aggggagggg gccgtgcagt ggtgaaccg gctgtagcgc 4500
 ttgccttcgc ggggtaacca cgtctccccc accgactatg tgcctgagag cgcagctgca 4560
 gcagctgtca ctcagatcct ctctagtctt accatcactc agctcgtgaa gaggcttcac 4620
 cagtggtatc acgaggactg ctccacgcca tgcctcgggt cgtggctaag agatgttttg 4680
 gatctgctat gcaaggtgtt gactgatttc aagacgtggc tccagtcgaa gctcctgong 4740
 cgtattcggc gactccctct ctctcatgtt caacgtgggt acaaggaggt ctggcggggc 4800
 gaaggcatca tgcaaacacc ctgcccattgt ggggcacaga tccacgggca tgtgaaaaac 4860
 ggttccatga ggtatgtggg gcttaggacc tglagtaaca cgtggatgg aaatccccc 4920
 attaaagcgt acaccacggg cccctgcacg cctcccccgg ccgcaaatca ttctagggcg 4980
 ctgtggcggt tggctcgtg gtagtacgtg gagggtacgc ggggtgggga ttccactac 5040
 gtgacgggca tgaccactga cgcagtaaa gtcctcgtc aggttcgggc ccccgaaatc 5100
 ttcaacagag tggatgggtt ggggttcgac cagcgtgcaa accctccta 5160
 cgggaggggg tccatctctt ggtggggctc aatcaatacc tggctgggtc acagctccca 5220
 tgcgagcccg aaccggtatg agcagtgctc acttccatgc tccacgacc ccccccatt 5280
 accgaggagg cggtaagcg taggclggcc aggggatctc ctccccctt ggcacgtca 5340
 tcaagtagcc agctgtctgc gcttccctt aaggcaacat gcaatacccg tcatgactcc 5400
 ccggaagcty accctatcga gcccacccc ctgtggcggc aggatgtgg cgggaacatc 5460
 acccgcttg agtcagaaaa taaggtagta attttgact ctctcgagcc gctccaaagc 5520
 gaggaggtat agagggaaat atccgttccg gcggagatcc tgcggagggtc caggaaatcc 5580
 cctcagcga tgcccatatg ggcacgccc gattacaacc ctccactgtt agagtctgg 5640
 aaggaccccg actaagttcc tccagtggta caoggtgtc cattgcggcc tgccaaggcc 5700
 cctcagttac cacttcaag gagggaaggg accgttgtcc tglcagaalc taccgtgtc 5760
 tctgctcttg cggagctcgc cacagagacc ttggcagct ccgaatcgtc ggcctcgac 5820
 agoggaaggg caacgggccc tctgaaccag ccctccgacg accggcagc gggatccgac 5880
 gttagctcgt actcctccat gccccctt gagggggagc cgggggatcc cgtctcagc 5940
 gacgggtctt ggtctacgtt aagcagggag gctagttagg acgtcgtctg ctgctcgatg 6000
 tctacacat ggacaggcg cctgatcacg ccctgcgtc cggagggaac caagctgcc 6060
 atcaatgac tgagcaactc ttgtctcgt caocacaact tggctctatg tacaacatct 6120
 cgcagcgcaa gctcgggca gaagaaggct acccttgaca gactgcagg cctggacgac 6180
 caactacggg acgtgtcaa gtagatgaag gogaaggcgt ccacagttaa ggttaaac 6240
 ctatccgttg aggaagcctg taagctgacg ccccccacat cggccagatc taaatttg 6300
 talggggaac aggaagctcg gaacctatcc agcaaggcgg ttaaccacat ccgtccgtg 6360
 tggaaaggact tgcgtggaag cactgagaca caattgaca ccacatcat ggcacacac 6420
 gaggttttct gcgtccaacc agagaagggg ggcgcgaagc cagctcggct tatcgtatc 6480
 ccagatttgg ggttctgtgt gtcgagaaaa atggccctt actcgtggt ctccacccc 6540
 cctcagggcg tgatgggctc ttcatcagga ttcaaatct ctctggaca ggggctcg 6600
 ttctcgttga atgctggaa agcgaagaaa tgccctatgg gcttcgata tgacacccc 6660
 tcttttgaat caacggtcac tgagaatgac atccgtgttg aggagtcact ctacaaatg 6720
 tctgacttgg ccccggaagc cagacagggc ataaggtcgc tcacagagcg gctttacac 6780
 gggggccccc tgactaatc taaggggag aactgcggct atcgcgggt cgcggcggc 6840
 ggtgtactga cgaacagctg cggtaatacc ctcaatgtt actgaaggc cgtgcggcc 6900
 tgtcagagct cgaagctcca ggaactgac atgctcgtat gcggagagca ccttgcgtt 6960
 atctgtgaaa gcgcggggac ccaagagyac gaggcgagcc tacgggccc caggagggt 7020
 atgaactagat actctgccc ccctgggac ccgcccacac cagaatacga cttggagt 7080
 alaacatcat gctcctccaa tlylcaaglc ygcacgag catctgpa aagggtgtac 7140
 tatctacccc gtgacccac cacccccct gcgcgggct cgtgggagc agctagacac 7200
 actocagtc attcctggt aggcacate atcatgtat cgcocacott gtyggcaag 7260
 atqatctga tgactcatt ctctccatc ctcttagctc aggaacact tgaacaaagc 7320
 ctngattgtc agatctacgg ggcctgttac tccattgag cactgacct acctcagac 7380
 attcaacgac tccatggcct taggcattt tcactccata gttacccccc aggtgagac 7440
 aatagggtg cttcatgct caggaaact ggggtacgc ccttgcgagt ctggagacat 7500

92

【0146】

* * 【外27】

cgggccagaa gtgtcgggc taggtactc tcccagggg gaggggctgc cactgtggc 7560
 aagtacctct tcaactggg agtaaggacc aagctcaaa tcaactcaat cccggctgcg 7620
 tcccagttgg atttatccag ctggttcgtt gctggttaca cggggggaga catatcac 7680
 agcctgtctc gtgcccagc ccgctgggtt atgtgggtgc tactcctact ttctgtagg 7740
 gtaggcatct atctactccc caacagatga acggggagct aaacactcca ggccaatag 7800
 coactcgtt tttttccct tttttttt tttttttt tttttttt tttttttt 7860
 ttttctcctt ttttttct cttttttt ttttcttcc tttgggtggt ccatcttagc 7920
 cctagtacag gctagctgt aaaggtcgt gagccgctt actgcagaa gtgctgatac 7980
 tggcctctct gcagatcaag t

【0147】

【外28】

93

<210> 9
 <211> 11076
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

<400> 9

```

gcaagccccc gattgggggc gacactccac catagatcac tccccgtga ggaactactg 60
tcttcccgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tctcgtgcag cctccaggac 120
ccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggnaaccggg gattacacag gaattggcag 180
gacgacgggg tcccttcttg gatcaacccg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
gcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtgttact gctgatagg 300
gtgcttgcga gtgccccggg aggtctctga gacogtgcac catgagcaag aatcctaacc 360
ctcaaaagaa aacaaaagc aacaccaacg ggccgcccac gattgaacaa gatggattgc 420
acgcagggtc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgaactg gcacaacaga 480
caatcggtcg ctctgatgcc ggcgtgttcc ggctgtcagc gcaggggcgc ccggttcttt 540
ttgtcaagac cgaacctgtc ggtgcctga atgaactgca ggacgaggca gcgcggctat 600
cgtggctggc cagcagcgcc gttccttgcg cagctgtgct cagcgttgc actgaaggcg 660
gaagggactg gctgctattg ggccaggtgc cggggcagga tctcctgtca tctcaacttg 720
ctccctcgca gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcy ggggtgcat accgttgatc 780
cggtctacct cccattcgac caaccaagca aacatcgcat cagagagaca cgtactcgga 840
tggtagccgg tcttctcgat ccgatgata tggacgaaga gcatcagggg ctgcgcacag 900
ccgaactgtt cgcaggtc cagcggcgca tgcgcgacgg caggatctc gtcgtgacct 960
atggcgatgc ctgcttgcgg aatatcatgg tggaaaatgg ccggtttctt ggtatcatcg 1020
actgtggcgg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggct acccgtgata 1080
ttgctgaaga gcttggcggc gaatgggctg accgcttctt cgtgtcttac ggtatcgccg 1140
ctcccgattc gaagcgatc gcttctatc gcttcttga cagttcttc tgagttttaa 1200
cagaccacaa cgglttccct ctacgggat caattccgac cctctccctc cccccccct 1260
aacgttactg gccgaagccg cttggaataa ggcgggtgtg cgtttgtcta tatgttattt 1320
tccaccatat tgcgctcttt tggcaatgtg agggcccgga aacctggccc tgtctctctg 1380
acgagcattc ctagggtctt ttccctctc gccaaaggaa tgcaaggctc gttgaatgtc 1440
gtgaaggaa gcttctctt ggaagcttct atgcaatgcy agcgtctgt agcgacctt 1500
tgcaggcagc ggaacccccc acctggcgac agtgcacag cgttgcctct cgggcaaaa gccacgtgta 1560
taagatacac ctgcaaaagg ggcacaaacc cagtgcacag ttgtgagttg gatagttgtg 1620
gaagagatca aatggctctc ctcaagcgtc tcaacaaggg gctgaaggc tgcccagaag 1680
gtaccccat tcatgggac tcatctgggg cctcgggtgca catgctttac atgtgtttag 1740
tcgaggttaa aaaaagctta ggcoccccca accacgggga cgtggttttc cttgaaaaa 1800
cacgataaata ccatgggac gaactcataa cctcaaaaga aaaccaaag taacaccaac 1860
cgccgcccac aggaaglcuaa gttcccgggc ggtggtcaga tctcgggttg agtttacctg 1920
ttgcgcgcga gggcccccag gttgggtgtg ccgcgacta ggaagacttc cgaagcgtc 1980
caaccctgtg gaaggcgaca acctatccc ggcctcttat ggcattgag gcttgggtg 2040
gctcagcccg gttacccctg tccgctagt tggggcccca cggaccccc cgttaggtg 2100
ctcctgtcac cccgtggctc tccgctagt tggggcccca cggaccccc cgttaggtg 2160
cgcaacttgg gtaaggctat cgtatccctc acgtggggt cgcogcatct oatgggttac 2220
attcctgtcg tccggccccc cctagggggc gctgcaggg ccctggcgca tggcgtccg 2280
gttctggagg acggcgtgaa ctatgcaaca gggaaattgc ccggttgcct cttttctatc 2340
ttcctcttgg ctttgcgtgc ctgtttgacc atccagctt ccgcttatga agtgcgcaac 2400
gtatccggag tgtacctgt caggaacgac tgcctcaacg caagcattgt gtatgaggca 2460
ggggaatga lcatgcatac ccccggtgct gtgcccgtcg ttcgggagaa caactcctc 2520
cgctgctggg tagcgtcac tcccagctc ggcggcagga acgctagct ccccaactac 2580
acgatacgac gccatgtcga tttgctcgtt qgggcggctg ctctctgctc cgcctatgtac 2640
gtgagagata tctgcggatc tgttttctcc gtcgcccagc tgttcaactt ctgcctcgc 2700
cggcacgaga cagtacagga ctgcaattgc tcaatatatc ccggccact gacaggtcac 2760
cgtatggctt gggatatgat gatgaactgg tcaactacag cagccctagt ggtatcgac 2820
tcaactcgga tcccaacagc tgtcgtggat atggtggcgg gggccattg gggagtccta 2880
gcgggcttgc cctactattc catggtgggg aactgggcta aggtctgat tgtgatgcta 2940
ctccttgcgg cgttgcgg gggaaactat gtcacaggg ggaagatggc caaaaaaac 3000
ctcgggatta cgtccctctt tcaaccggg tcaactgca atgaactcct caaacctggg 3060
aacggcagct ggcacatcaa caggactgcc ctgaactgca atgaactcct caaacctggg 3120
ttcctcgtcg cgtgttctca cgtgcacaa gttcaactca ctggatgccc agagcgcatg 3180
gccaagctga gcccatcga ccggttgcgt cagggtgggg ggcacacac ttacaaatga 3240
tcacacagct cggaccagag gccttatgt tggcactacg cccccggcc gtcggtatc 3300
gtaccgcgg cgcaggtgtg tggctcagtg tactgcttca ccccaagccc tgtcylggly 3360
qggagagacg accggttcgg cgtccctaag tacagttggg gggagaatga gacggacgtg 3420
ctgcttctta acaacacgcg gccgcgcaa ggcactggt ttggctgtac atggatgaat 3480
agcactgggt tcaaccaagc gtgcgggggc ccccgctga acatcgggg gatcygcaat 3540

```

94

95

aaaaacottga ootgccccac
 tgggtgttogg ggcccttgggt
 cactacccctt gcaactgtcaa
 gagcacaggc tcaagccgcg
 agggacagat cagagcltag
 lglcccttca ccaacctacc
 glggagotao aatacctgta
 gagtatgtcc tgggtgtctt
 atgatgtctg tgaatagctca
 gcatccgtgg ccggggcgca
 tacatcaagg gcaaggctgg
 ctctctgtcc tgggtgtctt
 tctgtccggg ggcgggtttt
 ctgttctctg ctaggctcat
 ttgcaagtgt ggaacccccc
 acgtgtccgg tcccccaga
 ggtacaccta lgggtgtctca
 gggtctcatg gtgcatgtat
 gctctcatga agttggccgc
 cgggactggg cccacgcggg
 tctgataggg agaccaaagt
 atcttggggc tggccgtctc
 agccttgaag ggcagggggt
 cgaaggccctc ttggctgtcat
 ggggaggtcc aagtgtgtct
 gtgtgttggg ctgtctatca
 ataccccaaa tgtacaccaa
 ggcggttctc tgaacacatg
 gccgatgtca ttccggtgcg
 ccggtctctc acttgaaggg
 ttgggcatct ttccgggtgc
 ccggtcaggt ctatggaaac
 ccggccgtac cgcagacat
 agcactaagg tgcgggtgc
 tccgtgtccg ccaacctagg
 aacatcagaa ttggggtaag
 ggcaagtctt ttgcgacgg
 gagtgcact cnaactgact
 gagcgggtg gagcgcgact
 gtgcacatc caaacatcga
 ggcaagacca tcccatcga
 aagaagaaat gtgatgact
 tatfaccggg gcccttgatg
 acgggacgtc taatgacggg
 tgtgtcacc cagacagtga
 gtgcacaaag acgggtgtgc
 ggcatcttca ggtltgtgac
 ctgtgtcaggt gcatatagcg
 gttagggttc gggcttacct
 ttctgggaga ggcctttac
 aagcaggcag gagacaact
 gctcaggctc caactccatc
 acgtgtcagc ggcccaacgc
 aacacacacc ccataaccaa
 acgagcaact ggggtgtgtg
 acaggcagcg tgggtcatgt
 gacagggaag tcccttaccg
 tacatogaac agggaaatga
 caaacagcca ccaagcaagc
 atcgaagcct tctggggcaa
 ggcttgtcca ctctgcctgg
 atcaaccagc cgtccacacc
 gcggcccaac ttgtctctcc
 ggggtgtgtg gcagcatagg
 gcagggggtg cagggcagcl
 gaggacctgg ttaacctact

96

ggactgtctc cggagacacc
 gacacccaga tgggtgtctc
 ctttaccatc tcaagqlta
 atgcaattgg actcagagg
 ccgctgtctg ctgtctacaa
 ggctctgtcc actgggttga
 cgggtatagg tggcggttg
 ccttctctct ggggacggc
 agctgaggcc ggcctagaga
 tggpattctc tcttctctct
 cctggggcg gcatatgccc
 accacacaga gcatagcca
 cgtaggctgt atactctga
 atgggtgtta caatatatta
 cctcaacgtt cggggggggc
 gctaatcttt accatcacca
 ggctgtgtata accaaagtgc
 gctgtgtcgg aagggtgtct
 actgacaggt acgtacgttt
 cctacagagc ctgtgggttg
 tatcaactgg ggggacagaa
 cggccgcagg gggaggaga
 ggcactctcc gcgcctatta
 catcactagc ctcacaggcc
 caccgcaaca caatcttctc
 tgggtccggc tcaaaagacc
 tgtggacacag gacctcgtct
 caoctgcgcc agctcggacc
 cggcgggggc gaacgcaggg
 ctcttcgggg ggtccactgc
 cgtg-gcacc cgaagggttg
 caactatguy tcccggtct
 ccaggltggc catctacacg
 gtatgcagcc caagggtata
 ttccggggcg tatatgtcta
 gacatcacc aeggggtgcc
 tgggtgtctc gggggcgcc
 gacactatc ctgggcatcg
 cgtctgtctc gccacggcta
 ggaggtgtgt ctgtccagca
 gacatcaag ggggggagcc
 cggccggaag ctgtccggcc
 atccgtcata ccaactagcg
 ctltaccggt gacttcgact
 cltccagcct gaccgacact
 acgclcgag cggcgaggca
 tccaggagaa cggccctcgg
 gggctgtgtc tggtaagagc
 aaacacacca ggggtgtccg
 aggcclcacc cacatagacg
 cccclacctg gtagcatacc
 gtgggaccaa atgtggaagt
 cctgtctgat aggtcgggag
 atacatcatg gcatgcatgt
 aggcggagtc ctgacagctc
 gggcaggatc atcttgtccg
 ggagtngat gagatggaa
 gctcggcga gctcggcga
 ggaagctgct gctccgtgtg
 gcatatgtgg aatttcatca
 caaccccgcg atagcatcac
 ccaacatacc ctctgttcta
 cagcgtctct lclgctttct
 ccttgggaag qlgcttytgg
 uylgggacttt aaggtcatga
 cctctctatc ctctccctcg

97

gtgtgagcag cgatactgag tgggacgctg gggccagggg aggggggctg gcagtggatg 7560
 aacgggctga tagcggttcg ttcggggggt aaccacgtct ccccccacga ctatgtgctt 7620
 gagagcgagc ctgcagcagc tgtcactcag atcctctcta gtcttaccat cactcagctg 7680
 ctgaagagggc ttaccagctg gatcaacgag gactgctcca cggcatgctc cggctcgtgg 7740
 ctaagagatg tttgggattg gatatgcacg gtgttgactg atttcaagac ctggctccag 7800
 tccaagctcc lgcggcgatt gccggggatc ccttctctct catgtcaacg tgggtacaag 7860
 ggagtctggc ggggagcagg catcatgcaa accacctgcc catgtggggc acagatcacc 7920
 ggacatgtga aaaaacgggtc catgaggatc gtgggggcta ggaactgtag taacacgtgg 7980
 catggaacat tccccattaa cgggtacacc acggggccct gcacgcctc cccggcgcca 8040
 aattatttcta gggcgctgtg gcgggtgggt gctgaggagt acgtggagggt tacgggggtg 8100
 ggggatttcc actacgtgac gggcatgacc actgacgacg taaagtgcct gtgtcagggt 8160
 ccggcccccc aattctttcac agaagtggat ggggtgctgt tgcacaggta cgtccagctg 8220
 tgcaaaacccc tctacggga ggaggtcaca ttctgtgtcg ggctcaatca atactgtgt 8280
 ggggtcacagc tccccatgca gcccgaaacg gatgtagcag tggctcactc catgctcacc 8340
 gacccccccc acattacggc gggagcggct aagcgtaggc tggccagggg atctcctccc 8400
 cctctggcca gctcatcagc tagccagctg tctgctgctt ccttgaaggc aacatgcact 8460
 acccgctcatg actccccgga cgtgacctc atcgaggcca acctcctgtg gcggcaggag 8520
 atggggcgga acatcacccg cgtggagtca gaaataaagg tagtaatttt ggactctttc 8580
 gagccgctcc aagcgggagg ggtgagagg gaagtatccg ltcggcgga gatcctgctg 8640
 aggtccagga aattcccccg agcgtatgcc atatgggac gcccgatta caacctcca 8700
 ctgttagagt cctggaaagg cccggactac gtccctccag tggtaacagg gtgtccattg 8760
 ccgctggcca agggccctcc gataccact tcaaggagg agaggaagct tgtctgtgtc 8820
 gaactctacg tgtctctctg cttggcgagg ctgcacacag agactctggc cagctccgaa 8880
 tctgtggcgg tgcagagcgg caggcgaaac gctctctctg accagccctc cagcagcggc 8940
 gacgggggag cggagcttga gtcgtactcc lccatgcccc cctctgaggg gtagcggggg 9000
 gatcccgatc tcaaggacgg gtctctgtct accgtaagcg agggagctag tgaggacgtc 9060
 gtctgtctgt cgtatgtccta cacatggaca ggcggccctga tcacggccatg cgtgctggag 9120
 gaaaccaagc tgcccatcaa tgcactgagc aactctttgc tccgtcacca caactgtgtc 9180
 tatgctacaa catctcgag cgaagcctg cggcagaaga aggtcacctt tgacagactg 9240
 caggctcctgg aagaccacta cggggaagcg ctcaaggaga tgaaggcgaa ggcgtccaca 9300
 gtttaaggcta aactctctat cgtggaggaa gctgttaagc tgacggcccc acattcgcc 9360
 agatctaaat ttggctatgg ggcataagc gtccggaaac tatccagcaa ggcggttaac 9420
 cacatccgct cgtgttgga ggaactgtcg gaagacactg agacaccaat tgacaccacc 9480
 atcatggcaa aaaatgaggt tttctggctc caaccagaga agggggggcg cctttacgat 9540
 cgccttatcg tattcccgga tttgggggtt cgtgtgtgag agaaaatggc cctttacgat 9600
 gtgggtctcca cctccctcca ggcgtgtatg ggtctctctat acggattcca atactctcct 9660
 ggacagcggg tgcagttcct ggtgaatgcc tggaaagcga agaatgccc tatgggcttc 9720
 gcatatgaca ccgctgttt tgactcaac gtcaactgaga atgacatccg tgttgaggag 9780
 tcaatctaca aatgttgtga cttggccccc gaagccagac aggcataag gtcgtcaca 9840
 gagcggttt acatcggggg cccctgact aattctaaag ggcagaactg cggctatcgc 9900
 cgggtgcggc gtagcggtgt actgacgacc agctgaggta atacctcac atgttacttg 9960
 aaggccgctg cggcctgtcg agctgcgaag ctccaggact gcacgatgct cgtatgcgga 10020
 gacgaccttg tctgtatctg tgaagcgcg gggacccaag aggacgaggc ggcctacgg 10080
 gccctcaggg aggtatgac tagatactct gccccccctg gggacccgcc caaaccagaa 10140
 tacgacttg agttgataac atcaagctcc tccaatgtgt cagtccgca cgtatgctct 10200
 ggcaaaaagg tgtactatct caccctgac cccaccaccc ccttgggcg ggtgogtg 10260
 gagacagcta gacacactcc agtcaattcc tggctaggca acatcatcat gtatgogcc 10320
 aactgtgtgg caaggatgat cctgatgact cattctctct ccatcctctt agctcaggaa 10380
 caacttga aaagccctaga ttgtcagatc taccggggct gttactccat tgagccactt 10440
 gacctacctc agatcattca acgactccat ggccttagcg cattttcact ccatagttac 10500
 tctccagggt agatcaatag ggtggcttca tgcctcagga aacttggggg accgcccctg 10560
 cgaatctgga gacatcgggc cagaagtgtc cgcgttaggc tactgtccca gggggggagg 10620
 gctgccactt gtggcaagta cctcttcaac tgggcagtaa ggaccaagct caaactcact 10680
 ccaactccgg ctgctgtcca gttggattta tccagctggg tctgtgtctg ttacagoggg 10740
 ggagacatat atcacagcct gtctgtgtcc cgaacccgct ggttcattgt gtgctactc 10800
 ctactttctg taggggtagg catctatcta ctccccaac gatgaacggg gactaaaca 10860
 ctccaggcca ataggccatc ctgttttttt cctttttttt tttttttttt tttttttttt 10920
 tttttttttt tttttttttt tctttttttt tttctttttt tttctttttt tttctttttt 10980
 tggctccatc ttagccctag tcacggctag ctgtgaaagg tccgtgagcc gcttgactgc 11040
 agagagtctt gatactggcc tctctgcaga tcaagt 11076

98

<210> 10
 <211> 8001
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

```

<400> 10
gccagccccc gattgggggc gacactccac catagatcac tcccctgtga ggaactactg 60
tcttcacgca gaaagcgctc agccatggcg ttagtatgag tgtcgtgcag cctccaggac 120
ccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaacggg gagtacaccg gaattgccag 180
gacgacccggg tcttttcttg galcaaccgg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
gcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtggtact gcctgatagg 300
gtgcttgcca gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagcacg aatccctaac 360
ctcaagaaaa aaccaaacgt aacaccaacg ggccgcccac gattgaacaa gatggattgc 420
acgcagggttc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga 480
caatcggtctg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagg gcaggggggc ccggttcttt 540
ttgtcaagac cgaactgtcc ggtgccctga atgaactgca ggaagaggca gcgcggctat 600
cgtggttggc cagcaggggc gttcccttgc cagctgtgct cgactgtgtc actgaagggg 660
gaaggagact gctgctattg ggcgaaagtgc cggggcagga tctctgtca tctcaacttg 720
ctcctgcoga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggtgcac acgcttgatc 780
cggctacctg cccattcgac caccagcgga aacatcgcat cgagcgagca cglactcgga 840
tggaaagccg tcttgtcgat caggatgac tggacgaaga gcatcagggg ctgcgcacg 900
ccgaactgtt cgcagggctc aaggcgcgca tgcgcagcgg cgaggatctc gtcgtgaccc 960
atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg 1020
actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgtg atcaggacat agcgttggct acccggtgata 1080
ttgttgaaga gcttggcgcc gaattgggtg accgcttctc cgtgctttac ggtatcgccg 1140
ctcccgatcc gcaagcgatc gcttctatcc gccttcttga cgagttcttc tgagttttaa 1200
cagaccacaa eggtttccct ctagegggat caattccgcc cctctccctc cccccccctc 1260
aacgttactg gccgaagccg cttggaataa ggccgggtgt cgtttgtcta tatgttattt 1320
tccaccatat tgcggtcttt tggcaatgtg agggcccgga aacctggccc tgtcttcttg 1380
acgacatttc ctagggtctt tccccctctc gccaaaaggaa tgcagggtct gttgaatgtc 1440
gtgaagggaag cagttcctct ggaagcttct tgaagacaaa caacgtctgt agcgaccctt 1500
tgcaggcagc ggaaccccc accgtggcag aggtgcctct gcggccaaaa gccacgtcta 1560
taagatacac ctgcacagcc gcacacccc cagtgcacag ttgtgagttg gatagttctg 1620
gaaagagtca aatggctctc ctcaagcgta ttcaacaagg ggctgaagga tgcacagaa 1680
tgaccccat gtagggatc tgcctgggg cctcggtgca catgctttac atgtgtttag 1740
tcgaggttaa aaaaagtcta ggcctccgga accacgggga cgtggttttc ctttgaataa 1800
cacgataata ccatggcgcc tattacggcc tactcccaac agacgcgagg cctacttggc 1860
tgcatctca tagcctcac aggcgggag aggaaccagg tcgaggggga ggtccaaagt 1920
gtctccaccg caacacaaac ttctctggcg acctgcgtca atggcggtg ttggactgtc 1980
tatcatgttg ccggtcctaa gaccccttgc ggcccaagg gcccaatcac ccaaatgtac 2040
accaatgttg accaggaact cgtcggttgg caagcgcccc ccggggcgcg ttccttgaca 2100
ccatgcacct gcggcagctc ggacctttac ttggtcacga ggcacgcoga tgtcattccg 2160
gtgogcgogo gggggagcag cagggggagc ctactctccc ccaggcccg ctccactttg 2220
aagggtcttt cggcggttcc actgctctgc cctcggggc acgctgtggg catcttctcg 2280
gctgcccgtg gcacccgagg ggttgogaag gcgggtggac ttgtaccogl cgagtctatg 2340
ggaaccacta tgcggttccc ggtcttcacg gacaactcgt cccctccggc cglaccgcag 2400
acattccagg tggcccatct acacgcccc actggtagcg gcaagagcac taaggtgccg 2460
gctgcgtatg caggccaaag gtataagggt cttgtcctga acccgtecgt cgcgcacacc 2520
cagggtttcg gggcgatat gtctaaggca catggtatcg accctaaccat cagaatccgg 2580
gtaagggaaca taaccaaggg tgcctccatc acgtactcca cctatggcaa gtttcttgc 2640
gacgggtggtt gctctggggg cgcctatgac atcataatat gtgatgagtg ccaactcaact 2700
gactcgacca ctatcctggg catcggcaca gt.cctggacc aagcggagac ggctggagcg 2760
cgactcgtcg tgctcgccac cgttaacgct ccgggatcgg tcacccgtgc acatccaaa 2820
accgaggagg tgctctgtc cagcaactgga gaaatccct tttatggcaa agccatcccc 2880
atcgagacca tcaagggggg gagggcacctc attttctgac attccaagaa gaaatgtgat 2940
gagctcgcg cgaagctgtc cggcctcgga ctcaatgctg tagcatatta ccggggcctt 3000
gatgtatccg tcataccaac tagcggagac gtcattgtcg tagcaaggga cgctctaatt 3060
acgggcttta ccggcgactt cgactcagtg atcgactgca atacatgtgt caccagaca 3120
gtcgacttca gctggaccc gacotttccc attgagacga cgaccclgcc acaagacgcg 3180
gtgtcacgct cgcagcgcg aggcaggact ggtaggggca ggatggscal ttacaggttt 3240
gtgactccag gagaacggcc ctggggcatg ttgatctct cggttctgtg cgagtgtctat 3300
gacgcgggct gtgcttggtg cgagclcaay cccgccgaga cctcagttag gttgcgggct 3360
taactaaaca caccaggggt gccctctctc caggaccatc tggagttctg ggagagcgtc 3420
tttacaggcc taccacacat agacgcccac ttcttgtccc agactaagca ggcaggagac 3480
aacttcccc accctgtagc ataccaggct acggtgtgng ccagggtca ggctccacct 3540

```

101

ccatcggtgg accaaatgtg gaagtgtctc atacggctaa agcctaagct gcacggggcca 3600
 acgcccctgc lgtataggtc gggagccgtt caaaacgagg ttactaacac acaccccata 3660
 accaaataca tcatggcatg catgtcggct gacotggagg tegtacagag cacctgggtg 3720
 ctggttagggc gagtccatgc agctctggcc gngtatgtcc tgacaaacagg cagcgtgggtc 3780
 attgtggggca ggaatcatctt gtccggaaag ccggccatca ttcccgacag ggaagtccct 3840
 taccgggagtl ccatgagat ggaagagtgcc gectcacacc tcccttacat cgaacaggga 3900
 atgcagctcg ccgaacaatt caaacagaag gcaatcggtt tgcgtcaaac agccaccaag 3960
 caagcggagg ctgctgctcc cgtgggtgaa tcaaagtggc ggaacatoga agccttctgg 4020
 gcgaagcata tgtggaattt catcagcggg atacaatatt tagcaggclt gtccactctg 4080
 cctggcaacc ccgcatagc atcactgatg gcattcacag cctctatcac cagcccgctc 4140
 accacccaac ataccctcct gtttaacatc ctggggggat ggggtggcgc ccaacttgc 4200
 cctccacagc ctgctctgco tttogtaggc goocgcctcg ctggagcggc tgttggcagc 4260
 atagcccttg ggaaggtgct tgtggatatt ttggcagggt atggagcagg ggtggcaggc 4320
 gcgctcctgg ccttaagggt catgagcggc gaggttgccc ccacggaggga cctggttaac 4380
 ctactccctg ctactcctct cctcggcgcc ctgctgctcg ggtcgtgtg cgcagcgata 4440
 ctgctgctggc acgtggggcc aggggagggg gctgtgcagt ggaagaaagg gctgatagcg 4500
 ttgctctcgc ggggttaacca cgtctccccc acgcactalg tgcttgagag cgaagctgca 4560
 gcacgagtcac ctcatgctct ctctagtctt accatcactc agctgctgaa gaggcttccac 4620
 cagtgagatca acgaggactg ctccacggca tgcctcgggt cgtggttaag agatgttttg 4680
 gattggatat gcacgggtgtt gactgatttc aagacctggc tccagtccaa gctcctggcc 4740
 cgattggccgg gagtccctct ctctctcatgt caacgtgggt acaaggaggt ctggcggggc 4800
 gcagcgatca tgcacacacac ctgcccattgt ggagcagaga tcacgggaca tgtgaaaaac 4860
 ggttccatga ggaatcgtgg gcttaggacc ttagtaaaac cgtggcatgg aacatcccc 4920
 attaacggct acaccaagg ccctgcacg cctcccccgg cgcaaatla tctaggggc 4980
 ctgtggcggt taggtgtctga ggaagtacgt gagggttacg ggtgggggga tttccactac 5040
 gtgcgggga tgaacctga caacgttaag tgcctgtgtc aggttccggc ccccgaaatc 5100
 ttccacagaag tggatgggggt cgggttgcaac aggtacgctc cagcgtgcaa acccctccta 5160
 cgggaggagg tcaatctctt ggtcgggctc aatcaatacc tggttgggtc acagctccca 5220
 tgcgagcttg aaccggatgt agcagtgtct acttccatgc tcaacgaccc ctocccactt 5280
 aocggcgaga cgggttaagc taggctggcc aggggatctc ccccccctt ggccagctca 5340
 tcagctagcc agctgtctgc gcttcccttg aaggcaacat gcactaccgc tcatgactcc 5400
 ccggacgctg aocctcatga ggccaaacct ctgtggcgcc aggagatggc cgggaacatc 5460
 acccgctgg agtcagaana taaggtatgt attttggact cttttagagc gctccaagcg 5520
 gaggagtag agaggggagt atccgttccg gggagatcc tgcygaggtc caggaaatcc 5580
 cctcgagcga tgcctatag ggcaagcccg gattacaacc ctccactgtt agagtccctg 5640
 aaggaccgg actacgtccc tccagtggta caccgggtgtc cattgccgcc tgcacaggcc 5700
 cctccgatac cacttccagc gagggaagg acggttgtcc tgtcagaatc tacctgtct 5760
 tetgcttgg cggagctggc caacagagacc tccgagatcc ccgaatcgtc ggcctgcagc 5820
 agcggcagcg caacggcctc tcttgacacg cctccgagcg acggcgagcc gggatccgac 5880
 gttgagtggt actcctccat gccccccctt gagggggagc cgggggagcc cgaatccagc 5940
 gcgggttctt ggttctacgt aagcggagg gctagtggg acgtcgtctg ctgctcgatg 6000
 tctacacat ggacagcgcc actgatccag ccatgcgctg cggaggaaac caagtctgcc 6060
 atcaatgcac tgaaccaact tttgctccgt caccacaact tggctctatgc tacaacatct 6120
 cgcagcgcaa accctggcgca gaagaaggct acccttgaca gactgcaggt cctggagac 6180
 caactaccgg acgtgtctaa ggagatgaag cogaaggcgt ccacagttaa ggctaaact 6240
 ctatccgtgg aggaagcctg taagctgacg cccccaact cggccagatc taaatttggc 6300
 tatggggcaa aggaactccg gaacctatcc agcaaggccg ttaaccacat ccgctccgtg 6360
 tggaaaggact tgcctggaaga cactgagaca ccaattgaca ccaacatcat ggnaaaaaat 6420
 gagggtttctt gcgtccaaac agagaagggg ggcgcgaagc cagctcgcct tatcgtattc 6480
 ccagattctg ggggttcgtg gtgcgagaaa atggcccttt acgatgtggt ctccaccctc 6540
 cctcaggcct ttcatacggc ttcatacggc tlcataact ctctggaca cggggtcgag 6600
 ttctctggtg atgctggaa agcgaagaaa tgcctatgg gcttcgata tgacacccgc 6660
 tgtttttgac caacgttcac tgagaatgac atccgtgttg aggagtaaat ctaccaatgt 6720
 tgtgacttgg cccccgaagc cagacaggcc ataaggtcgc tcacagagcg gctttacatc 6780
 gggggccccc tgactaatc taaaggcgag aactgcggct atcccggtg ccgcgcgagc 6840
 ggtgtactga cgaccagctg cggtaatacc ctccatgtt acttgaaggc cgtcgggccc 6900
 tgtcagagct cgaagctcca ggaactgacg atgctcgtat gcggagacga ccttgcctgt 6960
 atctgtgaaa gcgcggggac ccaaggaggc gaggcgagcc tacgggcctt caccgaggtc 7020
 atgactagat actctgcccc ccttggggac cggcccaaac cagaatacga cttggagttg 7080
 ataacatcat gntcctccaa tqtgtcagtc ggcacgagtg catctggcaa aagggtgtac 7140
 tatctcacc gtgacccca cccccctt gcgggggctg cgtgggagac agctagacac 7200
 actccagtc atctctggct aggcacatc atcatgtat cgcccaactt gtgggcaagg 7260
 atgactcclg lgaactattt ctctccatc cttctagctc aggaacaaat tgaaaaagcc 7320
 ctgattgttc agatctacgg ggcctgttau tcaattgagc cacttgacct acctcagac 7380
 attcaacgac tccatggcct tagcgcatct gttactctcc aggtgagatc 7440
 aatagggtgg cttctgcct caggaaactt ggggtaccgc ccttgcagat ctggagacat 7500

102

gcacggggcca 3600
 acaccccata 3660
 cacctgggtg 3720
 cagcgtgggtc 3780
 ggaagtccct 3840
 cgaacaggga 3900
 agccaccaag 3960
 agccttctgg 4020
 gtccactctg 4080
 cagcccgctc 4140
 ccaacttgc 4200
 tgttggcagc 4260
 ggtggcaggc 4320
 cctggttaac 4380
 cgcagcgata 4440
 gctgatagcg 4500
 cgaagctgca 4560
 gaggcttccac 4620
 agatgttttg 4680
 gctcctggcc 4740
 ctggcggggc 4800
 tgtgaaaaac 4860
 aacatcccc 4920
 tctaggggc 4980
 tttccactac 5040
 ccccgaaatc 5100
 acccctccta 5160
 acagctccca 5220
 ctocccactt 5280
 ggccagctca 5340
 tcatgactcc 5400
 cgggaacatc 5460
 gctccaagcg 5520
 caggaaatcc 5580
 agagtccctg 5640
 tgcacaggcc 5700
 tacctgtct 5760
 ggcctgcagc 5820
 gggatccgac 5880
 cgaatccagc 5940
 ctgctcgatg 6000
 caagtctgcc 6060
 tacaacatct 6120
 cctggagac 6180
 ggctaaact 6240
 taaatttggc 6300
 ccgctccgtg 6360
 ggnaaaaaat 6420
 tatcgtattc 6480
 ctccaccctc 6540
 cggggtcgag 6600
 tgacacccgc 6660
 ctaccaatgt 6720
 gctttacatc 6780
 ccgcgcgagc 6840
 cgtcgggccc 6900
 ccttgcctgt 6960
 caccgaggtc 7020
 cttggagttg 7080
 aagggtgtac 7140
 agctagacac 7200
 gtgggcaagg 7260
 tgaaaaagcc 7320
 acctcagac 7380
 aggtgagatc 7440
 ctggagacat 7500

【0152】

cgggccagaa gtgtccggc taggctactg
 aagtaactct toaactgggc agtaaggacc
 tcccagtttg attatccag ctggttctgt
 agcctgtctc gtgcccgacc ccgclgggtt
 gtaggcatct atctactccc caaccgatga
 ccactcgtgt tttttccctt tttttttttt
 tttttctcct tttttttcct ctttttttcc
 cctagtcacg gctagctgtg aaaggtccgt
 tggcctctct gcagatcaag t

40 【外33】

tcccaggggg ggagggtgct cacttctggc 7560
 aagctcaaac tcaactccaa cccggtctgg 7620
 gctggttaca cggggggaga catatatca 7680
 atgtgg-gcc tactcctact tctctgtagg 7740
 acggggagct aaacactcca ggcacatagg 7800
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt 7860
 tttttcttcc ttttggtggc ccatcltayc 7920
 gagccgcttg actgcagaga gtgctgatac 7980
 8001

【0153】

【外34】

103

<213> 11
 <211> 11075
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

104

<400> 11
 gccagccccc gattgggggc gacactccac catagatcac tccctgtga ggaactactg 60
 tcttcaacga gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tctgtgcag cctccaggac 120
 ccccccctcc gggagagcca tagtggctcg cggaaaccgg tagtacaccg gaattgccag 180
 gacgacccgg tcccttcttg gatcaaccgg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
 gcgagactgc tagccagta gtgttgggtc gggaaaggcc ttgtggtact gcctgatagg 300
 gtgcttgcca gtgccccggg aggtctcgta gacgtgcac catgagcacg aatcctaac 360
 ctcaaaagaa aaccaaagc aacaccaacg ggcgcgccat gattgaacaa gatggattgc 420
 acgacgggtt tccggcgcgt tgggtggaga ggcctattcg ctatgactgg gcaaaacaga 480
 caatcggtcg ctctgagcc gccgtgttcc ggcgtgcagc gcaggggcgc ccggttcttt 540
 ttgtcaagac cgaacctgtc ggtgcctga atgaactgca ggcagaggca gcgcggctat 600
 vgtggctggc cagacgggc gtctcttggc cagctgtgct cgaactgtc actgaaggcg 660
 gaagggaact gctgctatt ggcaagtgcc cgggcaggga tctctgtca tctcaccttg 720
 cctctcgcca gaagtatcc atcatggctg atgcaatggc ggcgtgcct acgcttgatc 780
 cggctacccg cccattcgac caacaagcga aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga 840
 tggaaagccg tcttctcgat caggatgata tggacgaaga gcatcagggg ctgcgcccag 900
 ccgaactgtt cgcacggctc aaggcgcca tgcgcgacgg cagagatctc gtcgtgaccc 960
 atggcgatgc ctgcttggc aatcatatgg tggaaatgg ccgcttttct ggattcatcg 1020
 actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgtggct acccgtgata 1080
 tctgtgaaga gcttggcggt gaattgggtg acgcttctc cgtgctttac ggtatcgccg 1140
 ctcccgatcc cagcgcctac gccctctatc gccctcttga cgaactcttc tgaattttaa 1200
 cagaacacaa cggcttccct ctagcgggat caattccgcc cctctcctc cccccccct 1260
 aacgttactg gcgaagccg ctctggataa ggcgggtgtg cgttctgtca tatgttattt 1320
 tccaccatatt tgcctcttt tggcaatgtg agggcccgga aacctggccc tgtctctttg 1380
 acgagcattc ctagggtgtc ttccctcttc gccaaaggaa tgcaggtgtc gtlgaatgtc 1440
 gtgaagggaag cagttctctt ggaagcttct tgaagacaaa caactctgt agcgacccct 1500
 tgcaggcagc ggaacccccc acctggcgac aggtgcctct gcggccaaaa gccactgta 1560
 taagatacac ctgcnaagcc ggcacacccc cagtgcacag ttgtgagttg gatagttgt 1620
 gaaagagta aatgctctc ctcaacaggt tcaacaagg gctgaaggga tgcacagaag 1680
 gtatgggtat gtatctgggg tctcgggtga catgctttac atgtgtttag 1740
 tccaggttaa aaaaactctt ggcaccccca accacgggga cgtggttttc ccttgaanaa 1800
 oacgaacata ccatgggccc cctcaagaa aacccaacg taacacac 1860
 cgcctccccc aggcagtcac gtcccggtc ggtggtcaga tctcgggtg agtttacctg 1920
 ttgcctcgca ggggccccag gttgggtgtg cgcgcgacta ggaagacttc cgaagcggtc 1980
 caaccctgtg gaaggcgaca acctatcccc aaggctcgcc agcccgaggg tagggccttg 2040
 gctcagcccc ggtacccctg gccctcttat ggcaatgagg gcttgggggtg ggcaggatgg 2100
 cctctgtcac cccgtggctc tgggccccag tggggcccc cgaaccccc gcgtaggtag 2160
 cgcacatttg gtaaggccat cgtacccctc acgtgcggct tgcgcgatct catgggtac 2220
 attccgctcg tcggcgcccc cctagggggc gctgccaggg ccttgccgca tggcgctccg 2280
 gttctggagg acggcgtgaa ctatgcacaa gggaaatctg ccggttgcct cttttctatc 2340
 ttctcttgg ctltgtctgc ctgtttgacc atcccagct ccgcttatga agtgcccaac 2400
 qtatccggag tgtaccatgt cagcaacgac tgcctcaacg caagcattgt gtatgaggca 2460
 ggggacatga tcatgcata ccccggtgct gtgcccgcg ttcgggagaa caactcctcc 2520
 cgtgtgtgg tagcctaac tcccacgctc gcggccaggg acgctagcgt ccccaactacg 2580
 acgatacagc gccatgtcga ttgtctgtt ggggcccgtg ctctctgtct cgtatgtac 2640
 gtgggagata tctgggata ctgtttctct gtgcgccagc tgttccactt ctgcctcgc 2700
 cggcacgaga caglacagga ctgcaattgc tcaatatatc ccggccacgt gacaggctac 2760
 cgtatggctt gggatatgat gatgaactgg tcaactacag cagccctagt gglatcgag 2820
 ttacacggga tcccaaaagc tgtctgggat atgggtggcg gggccacttg gggagtccta 2880
 gcgggctctg cctactattc catggtgggg aactgggcta aggttctgat tgtgatgcta 2940
 cctcttgcgc cgtttgaagg gggaaacctat gtagcagggg ggcagatggc caaaaacacc 3000
 cccgggatta cgtccctctt tteacccggg tcatcccaga aaatccagct tgtaaacacc 3060
 aaocggcagc ggcacatcaa caggactgoc ctgaactgca atgactcct caacactggg 3120
 ttccctgtct cgtgttcaa cgtgcacaaq tcaactcat ctggaatgccc agagcgcag 3180
 gccagctgca gccccatoga cgcgttcgct caggggtggg ggcacatcac ttacaatgag 3240
 tcacacagct cggaccagag gccctattgt tggcactacg ccccccgccc gtcgggtatc 3300
 gtaccccgcg cgcaggctg tggctccagt tactgcttca ccccaagccc tgtcgtggtg 3360
 gggacagccg aocggctcgg cgtccctacg tacagtggg gggagaaatga gacggacgtg 3420
 ctgctcttla acaacacgcg gccgcggcaa ggcactggt ttggctgtac atggatgaat 3480
 agcactgggt taccacagac gtcggggggt cccctgtga acatcggggg gatcggcaat 3540

【0154】

【外35】

105					106
aaacattga	cctgccccac	ggactgcttc	cygaagcacc	ccgagggccac	ttacaccaag
tggtggttcg	ggccttggll	gacacccaga	tgcttgggtcc	actaccacata	caggctttgg
caactacccol	gcaatgtcaa	ctttaccatc	ttcaagggtta	ggatgtacgt	ggggggagtg
gagcaaggc	tcgaagccgc	atgcaattgg	actcgaggag	ayuytgtaa	cctggaggac
agggacagat	cagagcttag	cccgtgtclg	ctgtctacaa	cgagtgga	ggtattgccc
tggttcctca	ccacccctac	ggctctgtcc	actggtttga	ccacccctca	tcagaaagtc
gtggacgtac	antacctgta	cggtataggg	tcggcggttg	ctccttttgc	aatcaaatgg
gaglatgtcc	tggtgctctt	ccttctctcg	gcggaogogo	gcgtotylgc	ctgcttgg
atgatgtctc	tgatagctca	agctgagggc	gcccagagag	acgtggtggg	cctcaacggc
gcatccgtgg	ccggggggca	tgccattctc	tccttctctg	tggtctctcg	tgctgctgg
tacatcaagg	gcaggtcgtg	ccttggggcg	gcataatgccc	tcacggcgct	atggcgcta
ctcctgtctc	tgctggcggt	accaccaaga	gcatacgcca	tggaacggga	gatggcagca
tcgtgctggag	gcgcgttttt	cgtaggtctg	atactcttga	ccttgtcacc	gcactataag
ctgttccctcg	ctaggtctcat	atggtggtta	caatatttta	tcacccgggc	cgaggccacac
ttggcaagtgc	ggatcccccc	cctcaacgtt	cgggggggcc	gcgatgcgct	catcctctcc
acgtgcgcgc	tcacccccga	gctaattctt	accatcaaca	aatottgct	cgcaatactc
gggtccactca	tggtgtctca	ggctgggtata	accaaagtgc	cglaacttct	gcgcgcacac
gggtctcatc	gtgcatgcac	gctggtgctg	aaggttgctg	gggttcatta	tgctccaaatg
gctctcatga	agtttgccgc	actgacaggt	acgtacgttt	atgacctct	caacccactg
cgggactctgg	cccaacggcg	cctacgagac	cttgcggtgg	cagltgagcc	cgctgtcttc
tcctgatattg	agaccaaagt	tatcactctg	ggggcagaca	ccgctggctg	tggggacatc
atcctggggcc	tgcccgctct	cgcccgcaag	gggagggaga	tacatctggg	accggcagac
agcctlgaag	ggcagggttg	gcgactcctc	gcgcctatta	cgccctactc	ccacagacg
cgagggctac	ttgggtgcat	catcactagc	ctcacgggcc	gggacaggaa	ccaggctcag
ggggaggtcc	aagtgtctct	caccgcacaa	caatctttcc	tggtcgacct	cgctcaatggc
gtgtgtttgga	ctgtctatca	tggtgcccgc	tcacaaagccc	ttgcccggcc	aaaggggccca
atcacccaaa	tgtaacccaa	tggtgaccaa	gacctctctg	gotggcaagc	gccccccggg
gcgcgttctc	tgacacccatg	cacctcgccg	agctcggaac	tttacttggg	ccagggcat
gccgatgtca	ttccggtgcy	ccggcggggc	gacagcaggg	ggagcctaact	ctccccagg
cccgctctct	acttgaagg	ctcttcgggc	gggtccactgc	ctgcccctc	ggggcagct
gtgggcatct	ttccgggtgc	cgtgtgcacc	cgaggggttg	cgagggcggt	ggactttgta
cccgctcgagt	ctatgggaac	caclatgcgg	tcoccggtct	tcacggcaaa	ctcgctccct
ccggccgtac	cgagagcatt	ccaggtggcc	catctacacg	ccctactctg	tagcggcaag
agcaclaaag	tgccggctgc	glatgcaggg	caagggtata	aggtgcttgt	cctgaacccg
tcocgtcgccg	ccacccctagg	tttcggggcg	tatalgtola	aggccactgg	tatcgacct
aacatcagaa	tcggggtaag	gacctacacc	acgggtgccc	ccatcaagta	ctccacctat
aggaaggttc	tlgcccagcg	tggttgctct	ggggggcgct	atgacatcat	aatatgtgat
gagtgccact	caactgactc	gacctactat	ctgggactcg	gcacagtcct	ggaccagcg
gagacggctc	gagcgcgact	cgctcgctct	gcacccgcta	cgccctcggg	atcggtcacc
gtgcccacac	caaacctcga	ggaggtggct	ctgtccagca	ctggagaaat	ccctctttat
ggcaaaagca	tcacccatoga	gaocatcaag	gggggggagc	acctcatttt	ctgccattcc
aggaagaaat	gtgatgagct	cgccgggaag	ctgtccggcc	tcggactcaa	tgctgtagca
tattaccggg	gccttgatgt	atccgtcata	ccactagcg	gagacgtcat	tgctgtagca
accggacgctc	taatgacggg	ctttaccggc	gacttcgact	cagtgtatga	ctgcaataca
tggtgcccac	agacagtcga	cttcagccgt	gacccgacct	tcacccattga	gacgacgacc
gtgcccacaag	acgggggtgc	acgctcgca	cgccgagggca	ggactggtag	gggcaaggatg
ggca..llaca	ggtttggtag	tcacaggaga	cgccctclog	gcattgttga	ttcctcggtt
ctgtgctgagt	gctatgaagc	gggctgtgct	tggtacgagc	tcacggccgc	cgagacctca
ttctgggttgc	gggcttaaccl	aaacacacca	gggttgcccg	tcctgccagga	ccatctggag
ttctgggttgc	ggcgtctttac	aggcctcacc	ccatagagc	cccatctctt	gtccacagact
uagcaggccag	gagacaaact	ccctacactg	glagcatacc	aggctacggg	gtgcgccaag
gctcaggctc	caacctccatc	gtgggaccaa	atgtgggaagt	gtctcatacg	gtcaaaagct
acgctgacag	ggccaacggc	cctgctgtat	aggctgggag	ccgttcaaaa	cgagggttaet
accacacacc	ccataaccaa	atcacatcat	gcattgcatgt	cggtgacct	ggaggtcgtc
ucgagcacct	gggtgctggt	aggcgagatc	ctagcagctc	lggcccgtga	ttgcttgaca
acaggccagcg	tggttcattgt	ggcgaggatc	atcttgtccg	gaagccgggc	catcattccc
gacagggaag	tcctttacgc	ggagttcgat	gagatggaa	agtgcgcctc	acacccctcc
tacatcgaa	agggatgca	gctcgcgcga	caattcaaac	agaaggcaat	cgggttgctg
aaacagcca	ccagcgaagc	ggaggctgct	gctcccglyg	tggaatccaa	gtggcgagac
atcgagacat	tcctggcgaa	gcataatgtg	aatttcatca	gcgggatata	atatttaaga
ggcttgccta	ctccgctcg	caaccccgcg	atagcatcac	tgatggcatt	ccacagctct
atcacacagcc	cgctcaccac	ccacacatcc	ctcctgttta	acatccctgg	gggatgggtg
gcccgcacac	ttgctcctcc	cagcgctgct	ctgcttctcg	taggcgcggg	catcgtlyga
gcgggtgttg	gcagcatagg	ccttgggaag	gtgctgttg	atattttggc	agggttatgga
gcagggggtg	caggcgctct	cglygctctt	aaggtcatga	gcggcgaggt	gcctccaccc
gaggacctgg	tlacccctact	ccttgcctac	ctctccctcg	gcggccctagt	cgctgggylc

107	108
ggtgtgcgcag	cgataactgcg
aaocgggtga	tagcgtttgcg
gagagcgagc	clgcagcacg
ctgaagaggg	ttcaccagtg
ctaagagatg	tttgggattg
tccaagctcc	tgccgcgatt
ggagtcclggc	ggggcgacgg
ggacatgtga	aaaacgggtt
catggaaacat	tcccaaltta
aattatttcta	gggcgtgtg
ggggatttcc	actaaglgac
ccggcccccg	aattcttcac
tgcaaacctg	tcctacggga
gggtcacagc	tcccatgcga
gacccctccc	acallacggc
cccttggtcca	gcacacagc
accogtcatg	actcccgga
atggggcgga	acatcccgx
gagccgctcc	aagcgaggga
aggtccagga	aatccctcg
ctgttagagt	ccctggaagga
ccgctgccc	agccctcc
gaatctaccg	tgtctctctg
tcgttcggcg	tcgacagcg
gacgcgggat	ccgagcttga
gatcccgatc	tcagcgacgg
gtclgtctgt	cgatgtctta
gaaaccaagc	tgcccatcaa
tatgclacaa	catctcgag
caggtctctg	acgancacta
glttaagcta	aacttctatc
agatctaaat	ttggctatgg
cacatccgct	ccgtgtggaa
atcatggcaa	aaaatgaggt
cgcccttatc	tattccaga
gtggctctcca	ccctccctca
ggacagcggg	tcgagttcct
gcataatgaca	ccgctgtttt
tcaatctacc	aatgttgtga
gagcggcttt	acatcggggg
cggtgcgcgg	cgagcggtgt
aaggccgctg	cgccctgtcg
gacgaccttg	tcgttatctg
goccttaacg	aggtcatgac
tacgaacttg	agllgalaac
ggcaaaaagg	tgtactatct
gacagagcta	gacacaccc
accttggtgg	caaggatgal
caacttgaaa	aagccclaga
gacatccctc	agatcatcca
tctccaggtg	agatcaatag
cgagtcgtga	gacatcgggc
gctgccactl	gtggcaagta
ccaatccgg	ctgcgtccca
ggagacatat	atcacagcct
ctactttctg	taggggtagg
ctccaggcca	ataggccatc
tttttttttt	tttttttttt
tggtcccatc	tttagccctag
agagagtgtc	gataactggcc
ggcccagggg	agggggctgt
aaaccacgtnt	ccccccagca
alccctctctta	gtcttaaccat
gaactgctcca	cgccatgctc
gtgttyactg	atttcaagac
ccctttctct	catgtcaacg
accacctgcc	catgtggagc
gtggggcccta	ggacctgtag
acgggcccct	gcacgcctc
gctgaggagt	acgtggagg
actgacaaacg	ttaaagtgc
gggggtgggt	tgacacagga
ttctctggctg	ggctcaatca
gatgttagcag	tgctcacttc
aagcgttaggc	tgggcagggg
tctgcgcctt	ccctgaaggc
atcgaggccca	acctcctgtg
gaaaataagg	tagtaatttt
ggagtatccg	ttccggcgga
atatgggcac	gcccggatta
gtccctccag	tggtacacgg
tcacggaggga	agaggacgg
ctcgccacag	agaccttcgg
gcctctctctg	accagccctc
tccatgcccc	cccttgagg
accgttaagcg	aggaggttag
ggcgccctga	tcacgcccag
aactctttgc	tccgtcacca
cggcagaaga	aggtcacctt
ctcaaggaga	tgaaggcgaa
gcctgtaagc	tgacgcccc
gtccgggaac	tatccagcaa
gaagacactg	agacaccaat
caaccagaga	agggggggcg
cgtgtgtgcg	agaaaatggc
ggctcttcat	acggattcca
tggaagcgga	agaaaatgcc
gtcactgaga	atgacatccg
gaagccagac	aggccataag
aattctaaag	ggcagaactg
agctgcggta	ataccctcac
ctccaggact	gcacgatgct
gggacccaaag	aggacgaggg
gccccccctg	gggacccgcc
tccaatgtgt	cagtcgcgca
ccccaccacc	cccttgccgg
tggttaggca	acatcatcat
cattttcttct	ccatcccttct
tcagggggcct	gttactccat
ggccttagcg	cattttcact
tgccctcagga	aacttggggt
cgcgctaggg	tactgtccca
tgggcagtaa	ggaccaagct
tcagctggtt	tcgttgctgg
cgaccccgcl	ggttcatgtg
ctccccacc	gatgaacggg
cccttttttt	ttttcttttt
ttctcttttt	tttctctttt
ctgtgaaagg	tcngtgagcc
tcaagt	

【図面の簡単な説明】

【図1】Aは本発明によるHCV-RNA構築物の構造を示している。Bはトランスフェクションして継代培養されたHu h-7細胞クローンにおける複製されたプラス鎖RNAの検出のための変性ホルムアルデヒド-アガロースゲル電気泳動の結果を示している。Cは選択された大部分の細胞クローンにおいて導入されたレプリコンDNAが存在しないことを証明するための引き続きのサザンブロットによるPCR試験の結果を示している。

【図2】AはHCV-RNA構築物を有する細胞クローン(9-13)における導入されたレプリコンDNA

40 (プラスミド分子I₃₇₇ / NS3-3' / wt)の高感度の排除のための引き続きのサザンブロットによるPCR試験の結果を示している。BはHCVのプラス鎖RNAおよびマイナス鎖RNAの定量的ためのノーザンブロット試験の結果を示している。CはHCV-RNA複製のダクチノマイシンに対する耐性を証明するための細胞内で複製されたHCV-RNAの放射性標識後のホルムアルデヒド-アガロースゲル電気泳動の結果を示している。

50 【図3】Aは代謝放射性標識後の免疫沈降による選択された細胞クローンにおけるHCV特異抗原の検出を示し

ている。BはHCV抗原の細胞内での所在の検出のための免疫蛍光試験の結果を示している。

【図4】図4は5' HCV-IRES、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (Neo^R)、異種の完全なHCV読み枠および確実な3' NTRからなる、本発明による選択可能なHCV-RNA構築物 (完全なゲノム) の構造の略図である。

【図5】図5はポリタンパク質をコードするヌクレオチド配列内に挿入された抗生物質耐性遺伝子 (単シストロン性RNA) (A) および3' NTR内に挿入された抗生物質耐性遺伝子 (2シストロン性RNA) (B) を有するHCV-RNA構築物の構造の略図である。

【図6】図6はNS3からNS5BまでのHCVレプリコンの一部として挿入されたリポーター遺伝子を有するHCV-RNA構築物の構造 (A)、耐性遺伝子およびリポーター遺伝子からなる融合遺伝子の一部として挿入されたリポーター遺伝子を有するHCV-RNA構築物の構造 (B)、耐性遺伝子およびリポーター遺伝子からなるレプリコンの一部として挿入されたリポーター遺伝子を有するHCV-RNA構築物の構造 (C)、自体の内部のリボソーム結合部位 (IRES) から発現される独立の遺伝子として挿入されたリポーター遺伝子を有するHCV-RNA構築物の構造 (D) の略図である。

【図7】図7は耐性遺伝子がリボザイムもしくはリボザイムのための認識部位を介してHCV-RNA配列と結合しているHCV-RNA構築物の構造の略図である。

【図8】図8は耐性遺伝子および導入された外来遺伝子を有するHCV-RNA構築物の構造の略図である。

【図9】図9は全RNAとインビトロ転写物との比感染力の比較のための方法プロセスを示している。

* 30

* 【図10】図10は9-13クローンの配列分析を示している。

【図11】Aはリポーター遺伝子の使用による複製アッセイの原理を示している。Bは親HCV-RNA構築物 I₃₈₉ / Luc / NS3-3' / wt (wt) または以下の変異体: 不活性RNA (318DN)、変異体9-13Fもしくは変異体5. 1でトランスフェクションした細胞におけるルシフェラーゼ活性の比較を示している。

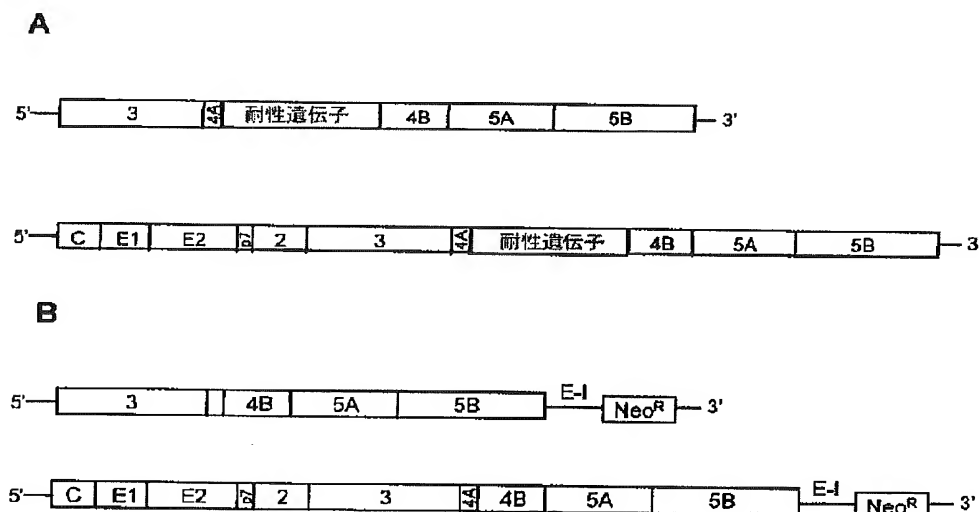
【図12】図12は選択可能なHCV全長ゲノム (構築物 I₃₈₉ / core-3' / 5. 1および I₃₈₉ / core-3' / 9-13F) を示しており、Aは全長構築物の略図であり、BはAに示される構築物 I₃₈₉ / core-3' / 5. 1のインビトロ転写されたRNA各0. 1 μgでHUH7細胞にトランスフェクションした後に得られるコロニーの数を示しており、Cは相応のインビトロ転写物のトランスフェクション後に得られるG418耐性細胞クローンにおける自律的に複製されるHCV全長RNAの検出を示している。

【図13】図13は1つのリポーター遺伝子を有するHCV-RNA構築物を示しており、Aは2シストロン性HCV-RNA構築物を示し、Bは単シストロン性HCV-RNA構築物を示している。

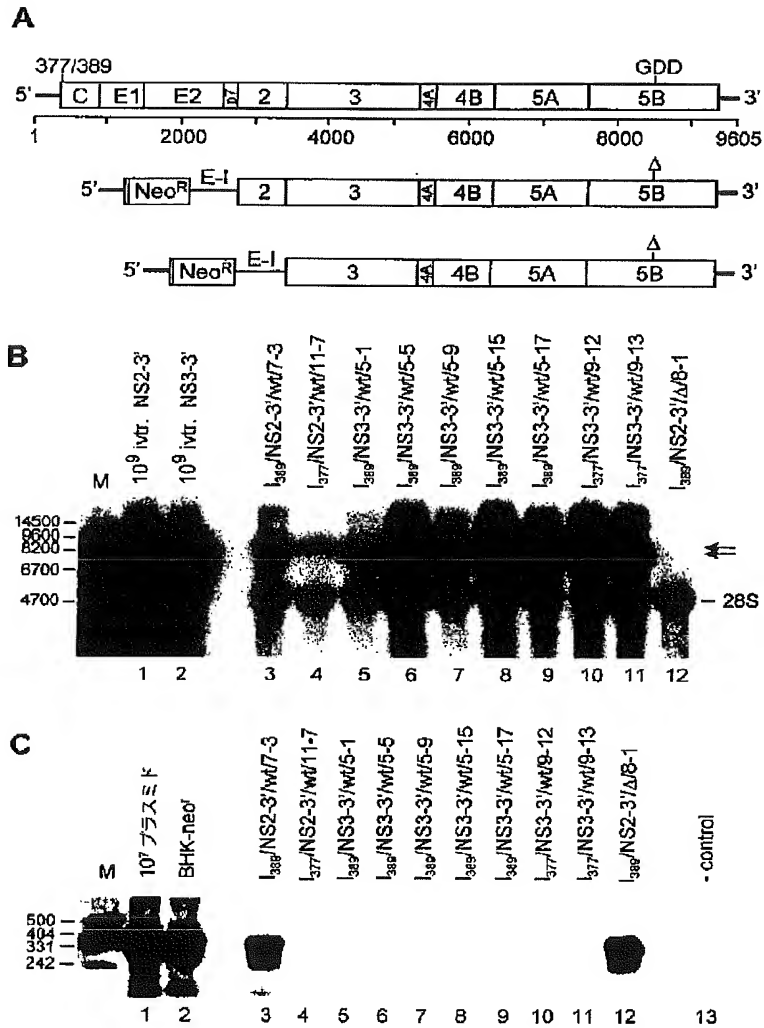
【図14】図14は耐性遺伝子に付加的に、挿入された外来遺伝子を有している3シストロン性のHCV全長RNA構築物を示している。

【図15】図15は耐性遺伝子がHCV成分を有する融合タンパク質として発現する単シストロン性HCV-RNA構築物を示している。

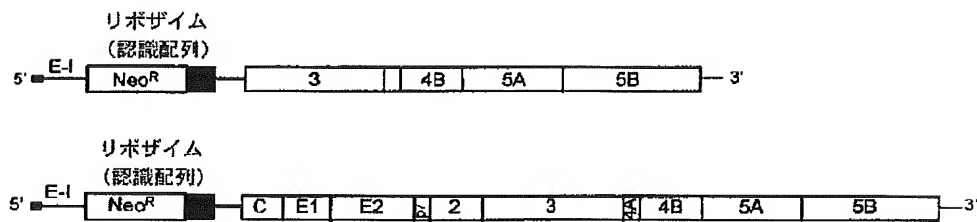
【図4】



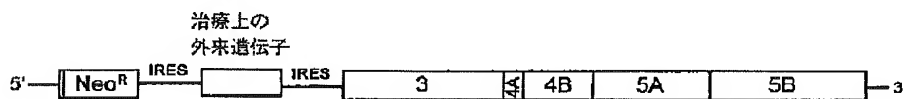
【図 1】



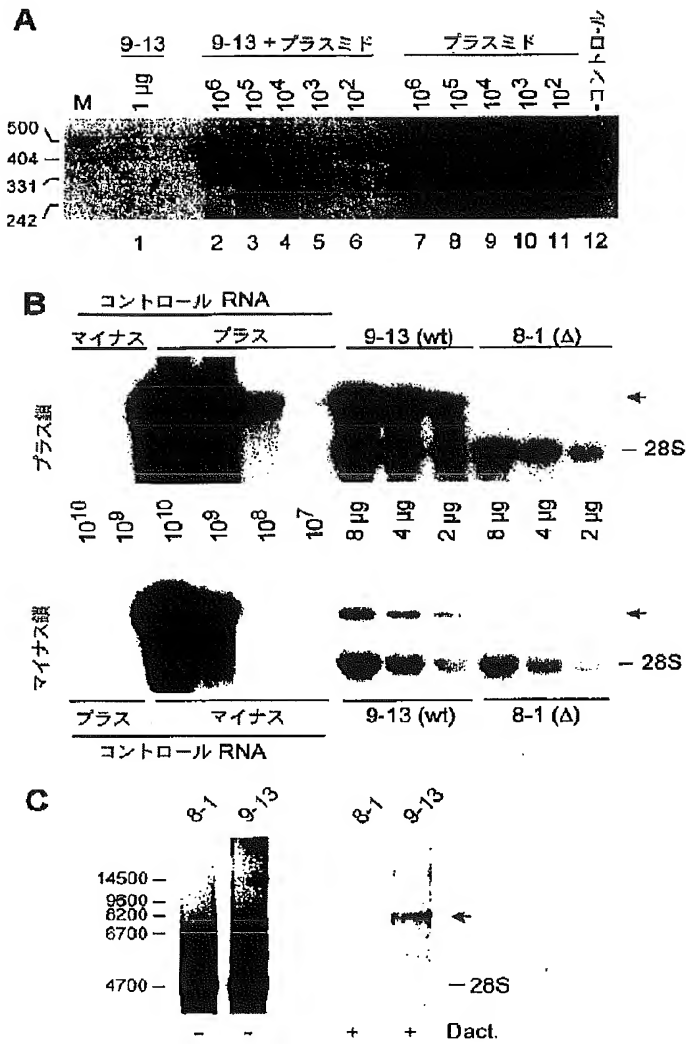
【図 7】



【図 8】



【図 2】



A

IP	9-13 (wt)	8-1 (Δ)	Transf.
3	5B	5B	5B
5B	5A	5A	5A
5A	3/4	3/4	3/4

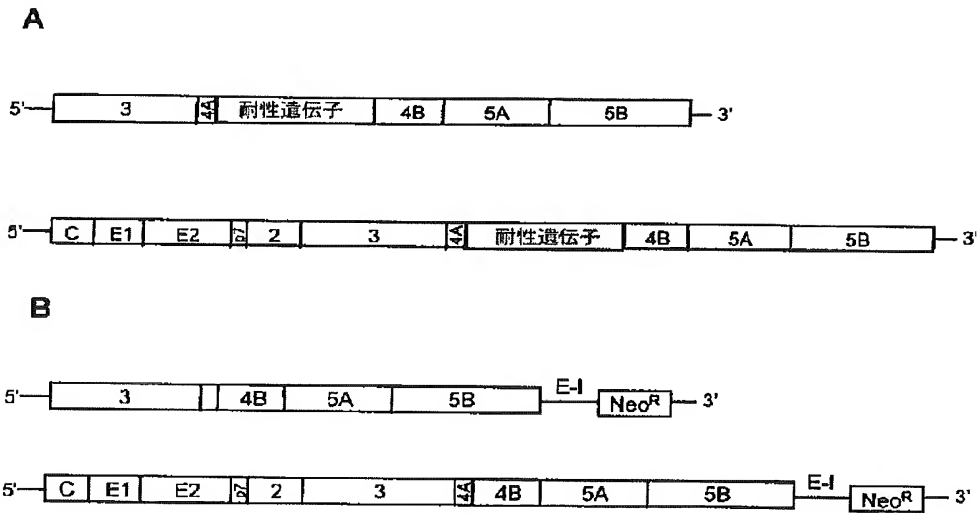
Molecular weight markers: 69, 43, 29, 19, 6.4

B

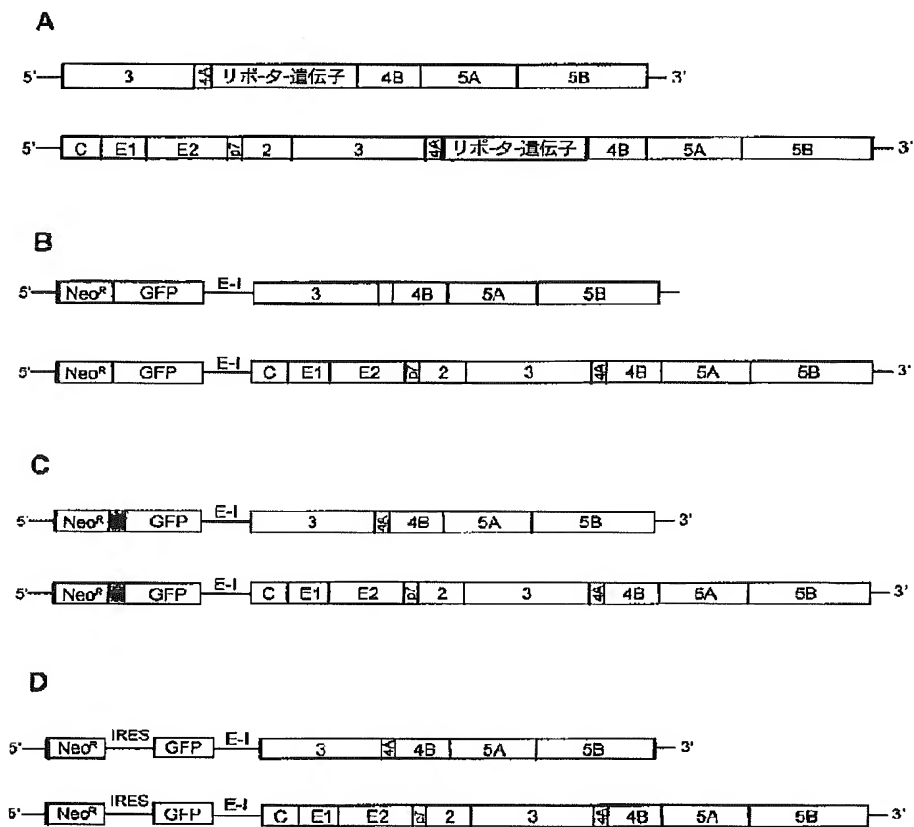
9-13 (wt)	8-1 (Δ)
NS3	NS3
NS5A	NS5A

Molecular weight markers: 69, 43, 29, 19, 6.4

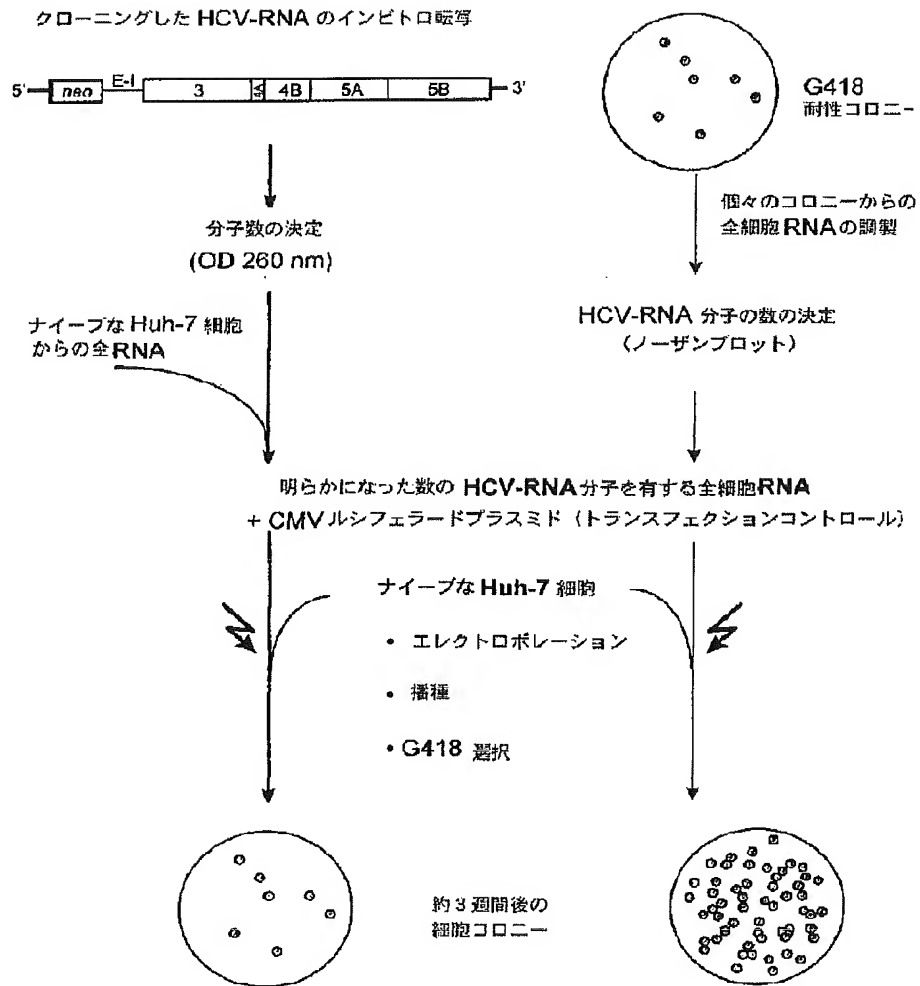
【図 5】



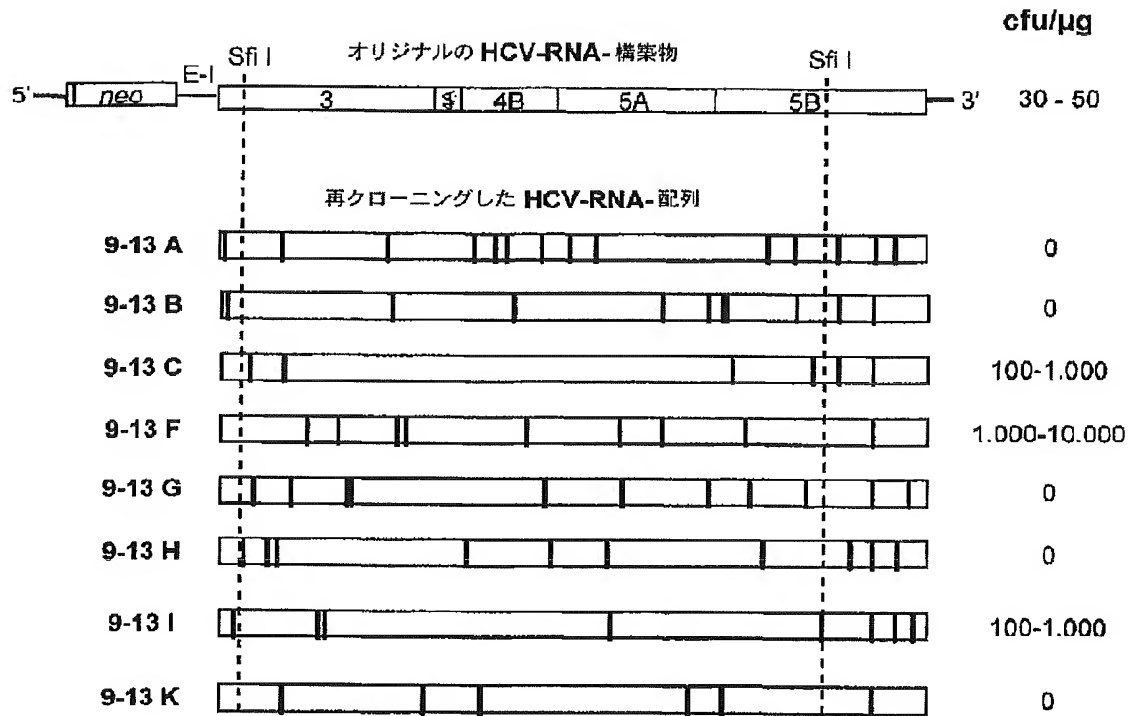
【図 6】



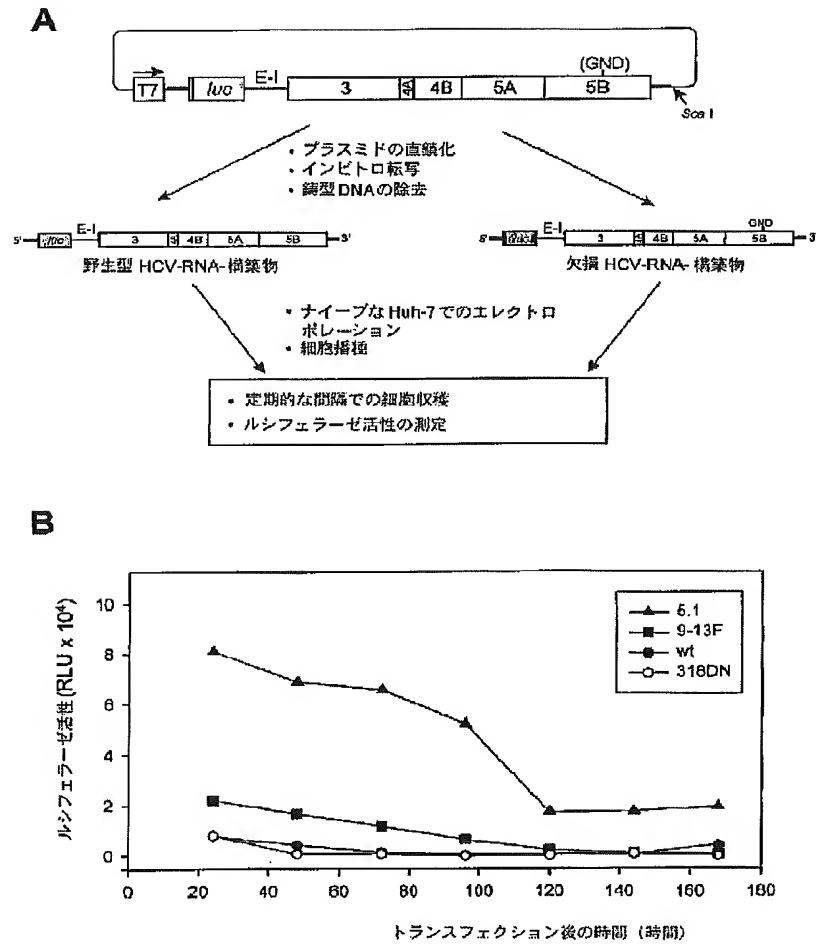
【図9】



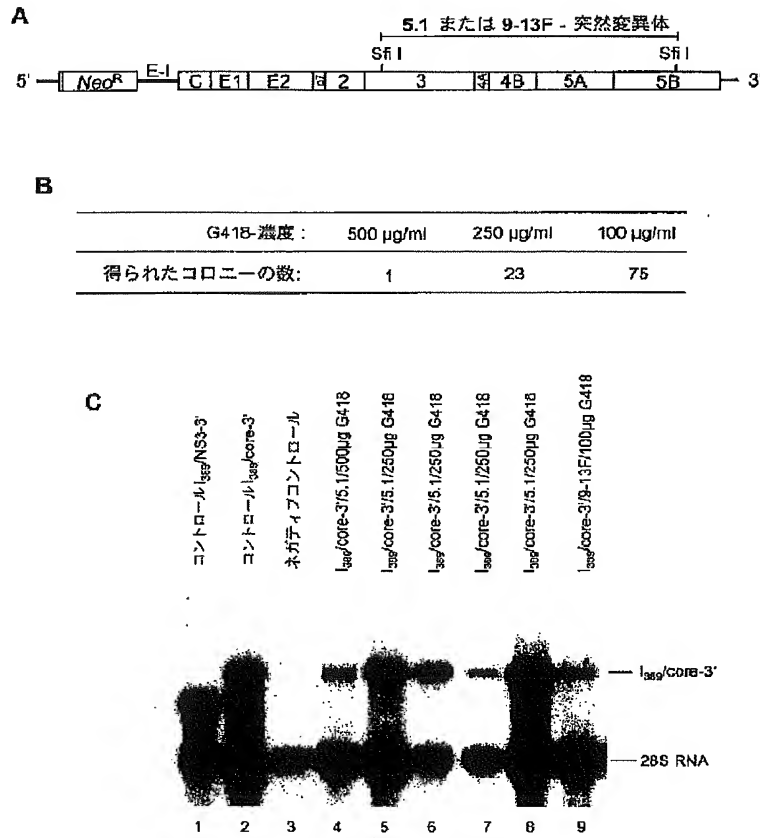
【図10】



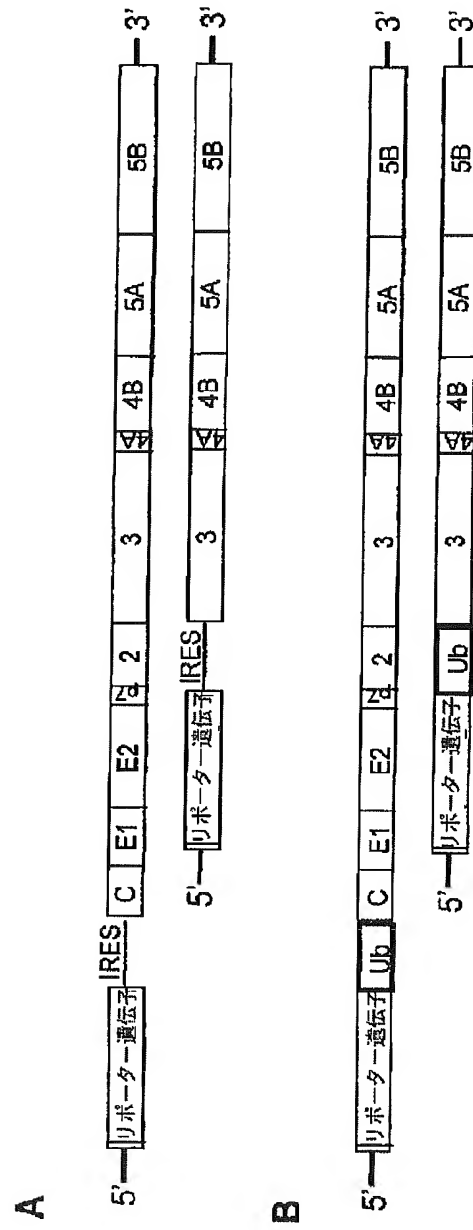
【図11】



【図12】



【図 13】



【図14】



フロントページの続き

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA33 CA04 CA11 DA02
EA04 GA12 HA01
4B065 AA90X AA96Y AB01 BA03
CA24 CA44 CA45

- (54) 【発明の名称】 C型肝炎ウイルス細胞培養系、C型肝炎ウイルス-RNA-構築物、細胞培養系または構築物の使用、C型肝炎ウイルス-RNA-構築物の細胞培養に適合した突然変異体を獲得する方法、C型肝炎ウイルス-全長ゲノム、C型肝炎ウイルス-部分ゲノム、または任意のC型肝炎ウイルス-構築物の突然変異体の製法、細胞培養に適合したC型肝炎ウイルス-構築物、その突然変異体、C型肝炎ウイルス-全長ゲノムの突然変異体、C型肝炎ウイルス粒子またはウイルス様粒子、およびこれで感染した細胞